

Aus der Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Jörg A. Auer, MS, Dipl. ECVS/ACVS

Aus der Abteilung Musculoskeletal Research Unit
Leiterin: PD Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

**Evaluation von vier biodegradierbaren, injizierbaren Knochenzementen in
einer experimentellen Studie in Schafen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

vorgelegt von
Oliver-Rolf Génot
Tierarzt
aus Zweibrücken (Deutschland)

Genehmigt auf Antrag von
PD Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. Dr. sc. techn. Marc Böhner, PhD , Korreferent

Zürich 2006

**Meinen Eltern, denen ich alles verdanke in Liebe
und
Anika, meinem Schatz**

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
<u>1. Einleitung</u>	5
1.1 Knochentransplantate	6
1.2 Knochenersatzstoffe	8
1.2.1 Biokeramiken	8
1.2.2 Polymere	8
1.2.3 Kalziumsulfat-hemihydrat	9
1.2.4 Kalziumphosphat Zemente	10
1.3 Problemstellung	11
<u>2. Material und Methoden</u>	12
2.1 Zementvorbereitung	12
2.2 Zemente	12
2.2.1 Brushite Zement mit chronOS™ Granulaten	12
2.2.2 Brushite Zemente ohne chronOS™ Granulaten	13
2.2.3 Kalziumsulfat	13
2.2.4 Norian Reinforced	13
2.3 Tiere	13
2.3.1 Vorbereitung	14
2.3.2 Operation	15
<u>3. Evaluation</u>	17
3.1 Radiologische und Mikroradiologische Evaluation	17
3.2 Makroskopische und histologische Evaluation	17
3.3 Histomorphometrie	19
3.4 Statistik	19
<u>4. Ergebnisse</u>	20
4.1 Operation	20
4.2 Postoperative Phase	20

4.3 Radiologische Ergebnisse	21
4.3.1 Brushite	21
4.3.2 Brushite/Granules	22
4.3.3 Kalziumsulfat	22
4.3.4 Norian Reinforced	23
4.4 Makroskopische Ergebnisse	23
4.5 Histologische Ergebnisse	24
4.5.1 Brushite	25
4.5.2 Brushite/Granules	27
4.5.3 Kalziumsulfat	28
4.5.4 Norian Reinforced	29
4.6 Histomorphometrische Ergebnisse der gesamten Kreisfläche	30
4.6.1 Brushite	31
4.6.2 Brushite/Granules	31
4.6.3 Kalziumsulfat	31
4.6.4 Norian Reinforced	32
4.7 Histomorphometrische Ergebnisse der Ringfläche	32
4.7.1 Brushite	32
4.7.2 Brushite/Granules	32
4.7.3 Kalziumsulfat	32
4.7.4 Norian Reinforced	33
4.8 Statistischer Vergleich der Zemente untereinander	34
<u>5. Diskussion</u>	34
5.1 Versuchsmodell	35
5.2 Probenaufbereitung und Auswertung	36
5.3 Ergebnisse	37
<u>6. Schlussfolgerung</u>	41
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	43
<u>8. Anhang</u>	46
<u>9. Danksagung</u>	68
<u>10. Curriculum vitae</u>	69

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden vier verschiedene injizierbare Zementformulierungen auf ihre Biokompatibilität und Resorption in acht unterschiedlichen Defektlokalisationen über einen Zeitraum von zwei, vier und sechs Monaten im Schafmodell untersucht. Die Zemente bestanden entweder aus Kalziumsulfat, einer Brushite Matrix, einer Brushite Matrix kombiniert mit fragmentförmigen β -TCP Granula oder Hydroxy Apatit Zement.

Acht Millimeter dicke Bohrlochdefekte wurden bilateral im Bereich der proximalen Epiphyse und distalen Metaphyse von Humerus und Femur eingebracht. Die Knochen-Zementproben wurden makroskopisch, radiologisch, histologisch und histomorphometrisch untersucht. Alle Zemente waren biokompatibel und zeigten keine Gewebeunverträglichkeiten. Die Zemente unterschieden sich vor allem in der Resorptiongeschwindigkeit und etwas weniger ausgeprägt in den zellulären Abbaumechanismen. Kalziumsulfat zeigte eine sehr variable Knochenneubildung in den Beobachtungszeiträumen auf und war schon nach zwei Monaten vollständig resorbiert. Während Brushite und Brushite/Granules erst nach sechs Monaten zu einem großen Teil resorbiert waren.

Norian Reinforced war auch nach sechs Monaten noch fast vollständig vorhanden und wurde im Gegensatz zu den anderen Zementen, die vor allem durch Makrophagen resorbiert wurden, von Osteoklasten abgebaut. Letztendlich sollte die klinische Anwendung der einzelnen Zemente nach der Resorptionsrate und den mechanischen Eigenschaften ausgerichtet sein.

1. Einleitung

Autologe, allogene und xenogene Transplantate wurden früher wie auch heute erfolgreich von Chirurgen als Knochenersatz und bei großen Frakturdefekten eingesetzt [1]. Diese Knochentransplantate besitzen sehr gute osteogenetische, osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften. Nachteilig jedoch sind beim autologen Transplantat eine Mengenbegrenzung und eine erhöhte Morbidität des Spenderareals. Des weiteren entsteht eine ernst zu nehmende Herausforderung bei der Entwicklung von Knochenbanken hinsichtlich des infektiösen Potentials bei allogenen und xenogenen Transplantaten [1-3]. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren die Suche nach Alternativen zu Knochentransplantaten verstärkt und sowohl natürliche als auch synthetische Knochenersatzmaterialien entwickelt.

Besonders Knochenersatzstoffe haben einige grundlegende Anforderungen zu erfüllen. Neben einer guten Biokompatibilität, d.h. keine toxische, immunologische und kanzerogene Wirkung des Materials muss die Übertragung von Krankheiten, im Sinne von Sterilität, ausgeschlossen werden [4].

Die Resorption des Ersatzstoffes muss in gleichem Maße zu dem sich neu bildenden Knochengewebe erfolgen. Letztendlich spielt auch die Handhabung und die Bearbeitung des Materials für den Chirurgen eine entscheidende Rolle.

Diesen Anforderungen werden besonders Kalzium-Phosphat Zemente gerecht [5]. Durch ihre Injizierbarkeit ermöglichen sie dem Operateur ein sauberes und präzises Arbeiten. Der größte Vorteil der Zemente liegt jedoch darin, dass ihre Einzelkomponenten abhängig von der jeweiligen klinischen Anwendung angepasst werden können.

1.1 Knochentransplantate

Als Knochentransplantat wird ein in den Defekt eingefügtes Material bezeichnet, welches alleine oder auch in Kombination mit anderen Materialien die Knochenheilung fördert. Dies erfolgt durch die lokale Bereitstellung osteogentischer, osteokonduktiver oder osteoinduktiver Aktivitäten [6, 7]. Gewebe mit lebenden Zellen, welche in der Lage sind sich zu knochenbildenden Zellen zu differenzieren, besitzen osteogenetische Eigenschaften. Die Osteokonduktivität eines Stoffes bezeichnet die Fähigkeit als Leitstruktur für einwachsende Gefäße und neu gebildete Knochenstrukturen zu fungieren. Dies unterscheidet sich zur Osteoinduktion, die durch einen biologischen Stimulus hervorgerufen, aus dem umliegenden Muskel und Bindegewebe stammenden Mesenchymalzellen zu Knochenzellen differenzieren lässt.

Knochentransplantate werden eingesetzt um Knochendefekte zu rekonstruieren, die Frakturheilung zu unterstützen, Arthrodesen zu überbrücken und um nach Entfernung von Knochentumoren entstandene Hohlräume zu füllen [4, 8].

Knochentransplantate können nach Herkunft und Zusammensetzung unterschieden werden.

Beim autologen Transplantat wird Knochenmaterial aus einem Individuum gewonnen und an einem Ort desselben eingesetzt. Man spricht, je nach Zusammensetzung des gewonnenen Materials, von aspiriertem Knochenmark, spongiosen- und kortikalen Transplantaten [6-8].

Für die Gewinnung von autologen Spongiosatransplantaten stehen, sowohl beim Menschen als auch beim Tier mehrere Entnahmeorte zur Verfügung: Der vordere Darmbeinkamm, der hintere Darmbeinkamm und der Trochanter major [9].

Vorteile beim Einsatz körpereigenen Knochenmaterials sind die Histokompatibilität des transplantierten Gewebes, die Übertragung von osteoblastischen Zellen und der Ausschluss des infektiösen Potentials. Als Nachteile sind die Verlängerung der Operationsdauer sowie der zusätzliche Blutverlust und ein mögli-

ches intraoperatives Umlagern des Patienten zu nennen. Weiterhin können Komplikationen, wie Wundinfektionen, Hämatome, Schmerzen und Neuralgien am Entnahmeort auftreten [9, 10]. Da die zu gewinnende Menge an körpereigenem Material begrenzt ist wird oft auch zu körperfremden Transplantaten gegriffen.

Dafür eignet sich allogenes Knochenmaterial welches von einem Individuum zu einem anderen, gleicher Spezies, übertragen wird. Je nach Transplantat kann zwischen kortikaler, spongiöser und osteochondraler Herkunft unterschieden werden. Das Einsetzen des Transplantates erfolgt meist im gefrorenen, gefriergetrockneten oder demineralisierten Zustand, da bei Einsatz von körperfremden Gewebe die Möglichkeit einer immunologischen Reaktion besteht, die zu einem verzögerten Einwachsverhalten bis hin zum vollständigen Abbau des Transplantates führen kann. Dennoch hat sich gezeigt, dass vorbehandelte allogene Transplantate in ihren Eigenschaften vergleichbar mit körpereigenen Transplantaten sind und aus diesem Grund als klinisch relevante Alternative anzusehen sind [11]. Vorteile bei allogenen Transplantaten sind die Haltbarmachung durch diverse Konservierungsverfahren und dass größere Mengen zu Verfügung gestellt werden können. Ein großer Nachteil besteht jedoch im Risiko der Übertragung von bakteriellen und viralen Krankheitserregern. Aus diesem Grund existieren strenge Richtlinien für die Gewinnung und Aufbewahrung von Transplantaten in Knochenbanken [12]. Indikationen für den Gebrauch von allogenen Transplantaten können traumatische oder posttraumatische Zustände, tumorchirurgische Eingriffe sowie Korrekturosteotomien sein.

Bei dem Einsatz von xenogenen Knochentransplantaten wird Knochengewebe von einer Spezies zur anderen übertragen. Um die immunologische Antwort auf das körperfremde Material so gering wie möglich zu halten, werden xenogene Transplantate deproteiniert und entfettet. Bei diesen Verfahren verlieren Knochenstrukturen jedoch weitgehend ihre osteoinduktive Eigenschaft. Verschiede-

ne Studien haben gezeigt, dass xenogene Transplantate deshalb lediglich von osteokonduktiver Natur sind [13, 14].

1.2 Knochenersatzstoffe

1.2.1 Biokeramiken

Bei Biokeramiken kann man zwischen bio-inerten, oberflächenaktiven und resorbierbaren Keramiken unterscheiden. Das Fehlen von lokaler und systemischer Toxizität, entzündlichen Reaktionen und die Fähigkeit des direkten Knochenanschlusses machen diese Gruppe einsatzfähig. Die Knochenregeneration ist jedoch vom Implantationsort und den dort zur Verfügung stehenden osteogenetischen Zellen sowie der Implantatstabilität abhängig [15-17].

1.2.2 Polymere

Polymere sind Makromoleküle, welche aus sich wiederholenden Monomeren bestehen und sich in ihren chemischen, biologischen und mechanischen Eigenschaften unterscheiden. Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Polymers haben die unterschiedlichen Monomere, die Startreagenzien und verschiedene Zusatzstoffe [18, 19]. Der Polymerisationsvorgang kann entweder chemisch oder mit Hilfe von Licht erreicht werden. Die Gruppe der Alipathischen Polyester sind Polymere, die oft in der Traumatologie verwendet werden. Hauptvertreter dieser Gruppe sind die Polyglykolsäure (PGA), Polylaktatsäure (PLA) oder PGA-PLA Verbindungen. Sie sind biokompatibel und verfügen zum Teil auch über osteokonduktive Eigenschaften. Sie werden gut toleriert, zeigen jedoch in einigen Fällen Fremdkörperreaktionen in der Nähe des Implantates. Der Abbau der Polymere kann über zwei Mechanismen erfolgen. Zum einen über die schrittweise Zersetzung (bulk erosion or surface erosion), zum anderen

über Hydrolyse[19]. Die Rate der Hydrolyse wird durch die Kristallinität und Hydrophobie der monomeren Einheiten bestimmt. Polymere sind ebenfalls als Trägersystem für Medikamente und mitogene Substanzen einsetzbar. Ein häufig gebrauchtes nicht abbaubares Polymer ist Polymethylmetacrylat (PMMA), das als Füllmaterial bei größeren Knochendefekten, zum Beispiel bei Vertebroplastien oder zur Fixierung von Hüftprothesen, verwendet wird [18, 20].

1.2.3 Kalziumsulfat-hemihydrat (CSH, $\text{CaSO}_4 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$) oder „Plaster of Paris“

Kalziumsulfat-hemihydrat wurde erstmals von Dreesman im 19. Jahrhundert vorgestellt und ist somit eines der ersten synthetischen Knochenersatzmaterialien[2]. Es ist ein resorbierbares und biokompatibles Material, über seine osteokonduktiven Eigenschaften gibt es jedoch gegensätzliche Meinungen [21, 22]. Durch Abgabe von Ca-Ionen, welche später dann Kalziumphosphat formen, wird ein osteoblastophiles Milieu im Bereich des Knochendefektes geschaffen [2, 21, 23]. KSH verfügt über eine geringe mechanische Stabilität und wird bei größeren Knochendefekten nicht, oder nur in Kombination mit anderen Materialien, eingesetzt. Durch seine Pasten-, oder Kitt-ähnliche Konsistenz lässt sich KSH an irregulär geformten Knochendefekten anpassen [18]. Klinisch kommt es zum Einsatz bei Knochenzysten und als Träger- oder Transportsystem für unterschiedliche Substanzen wie z.B. Antibiotika [4].

1.2.4. Kalziumphosphat Zemente

Kalziumphosphat Zemente (CPC) wurden in den achtziger Jahren von Brown und Chow entdeckt[24]. Trotz den multiplen Varianten ihrer Zusammensetzungen was die Einzelkomponenten betrifft, gibt es jedoch nur drei Endprodukte. Hydroxy Apatit (PHA), Brushite (DCPD) und amorphes Kalziumphosphat (ACP) welches sich rasch in Apatit konvertiert. Aus diesem Grund werden alle CPCs in die Gruppe der Apatit CPCs oder in die Gruppe der Brushite CPCs aufgeteilt[25].

Kalziumphosphat Zemente werden durch Mischen einer wässrigen Lösung mit Kalziumphosphat Verbindungen hergestellt. Nach dem Vermischen lösen sich die CPCs und präzipitieren in eine weniger lösliche Form. Während dieser Ausfällungsreaktion wachsen und vernetzen sich die Kalziumphosphatkristalle und führen damit zur mechanischen Stabilität des Zementes [25]. CPCs härten nicht durch Polymerisation aus. Dadurch kommt es auch nur zu geringer Wärmebildung. Kalziumphosphat Zemente verfügen über eine relativ geringe Stabilität und können deshalb nur in Kombination mit Metallimplantaten oder unter Bedingungen mit wenig Kraftbelastung eingesetzt werden. Die mechanische Belastbarkeit ist mit Kalziumphosphatblöcken ähnlicher Porosität zu vergleichen [25-27].

Ein kurzer Rückblick auf die Zementeigenschaften zeigt dass Apatit CPCs eine lange Aushärtungsphase besitzen. Um dem entgegenzuwirken werden Additive wie MCPM (Monocalcium Phosphat Monohydrat), Natriumhydrogenphosphat[28], Orthophosphat Ionen und Phosphorsäure[29] hinzugefügt [30-32]. Eine Reduktion der flüssigen Phase führt auch zu Verkürzung der Aushärtungsreaktion. Deshalb sind die meisten Apatit Zemente viskös und etwas schwieriger zu injizieren [33]. DCPD Zemente hingegen haben eine kurze Abbinde- und Aushärtungsreaktion, hervorgerufen durch die Tatsache, dass Brushite CPCs durch eine Säure-Base Reaktion entstehen und die Löslichkeit der basi-

schen Phase die Aushärtungsreaktion beeinflusst. Aus diesem Grund können DCPD Zemente sehr flüssig sein und trotzdem schnell aushärten [34].

Allgemein ist die Art und das Ausmaß der Zementdegradation durch seine chemischen und physikochemischen Charakteristika (Zusammensetzung und Dichte) sowie vom Implantationsort abhängig [35-37].

Es wird angenommen, dass die Biodegradation bei Brushite CPCs nicht nur durch zell-medierten Abbau (Osteoklasten, Makrophagen), wie bei Apatit CPCs, sondern auch durch Dissolution erfolgt[38, 39]. Dadurch kann es zu einer unreifen Knochenbildung (Faserknochen) kommen, weil sich die Brushite Matrix schneller abbaut als neues Knochengewebe entsteht. Durch Addition von β -TCP Granulat in die Zementpaste, welches als "Knochenanker" fungiert, kann die Abbaurate der Zement Matrix und die Aufbaurrate des Knochengewebes angepaßt werden [40]. Wie auch Apatit CPCs können Brushite CPCs als Träger-substanz für pharmakologisch wirksame Substanzen, wie beispielsweise Antibiotika, dienen [41]. Die Freisetzung von Gentamycin kann dabei in vitro durch Zusatz von Polyacrylsäure kontrolliert werden.

1.3 Problemstellung

DCPD Zemente wurden bereits mit großem Erfolg auf dem internationalen Markt eingeführt. Jedoch stehen noch einige Fragen offen wie zum Beispiel: Ob es die Möglichkeit gibt kosteneffektivere β -TCP Granulate in schon bestehende DCPD Zementformulierungen zu integrieren oder eine neue Matrix gänzlich ohne β -TCP Granulate zu entwickeln, welche immer noch den grundlegenden Anforderungen an Knochenzemente (gute Biokompatibilität, gute Knochenneubildung und gute mechanische Eigenschaften) entspräche. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Studie die Biokompatibilität, Zementresorption und Knochenneubildung vier neuer Knochenzementformulierungen bei einem Bohrloch-Modell über einen Zeitraum von zwei, vier und sechs Monaten zu testen.

2. Material und Methoden

2.1 Zementvorbereitung

Die Zemente wurden streng nach Herstellerangaben vermengt. Jeder Zement besaß sein eigenes Mixing-Kit, welches aus einem sterilen Beutel mit dem Zementpulver (feste Komponente) bzw. Kalziumsulfat und einer Spritze mit Natrium-Hyaluronsäure (flüssige Komponente) bestand (Fig. 2.1.1). Nach Injektion der flüssigen Komponente in den sterilen Beutel wurde dieser in einen speziell entwickelten Mixer platziert (Fig. 2.1.2). Nach Vermischung der beiden Komponenten konnte das Produkt relativ einfach in die Applikationsspritze gedrückt werden (Fig. 2.1.3). Die Spritze wurde dann vom Chirurgen übernommen und der Defekt konnte mit dem ihm zugewiesenen Zement aufgefüllt werden (Fig. 2.1.4).

2.2 Zemente

2.2.1 Brushite Zement mit chronOS™ Granulaten

Bei Schafen, in denen Brushite mit chronOS™ Granulat zum Einsatz kam wurden pro Tier 22,32 g steriles Pulver, bestehend aus 42% β -TCP Pulver, 21% MCPM, 31% β -TCP Granula (Im Unterschied zu chronOS Inject liegen hier die Granula nicht in sphärischer sondern in fragmentartiger Form vor. Die Granula haben eine Durchschnittsgrösse von $<0,5\text{mm}$), 5% Magnesiumhydrogenphosphat Trihydrat und weniger als 1% Dinatriumdihydrogenpyrophosphat und Magnesiumsulfat mit 10 ml steriler 0,5%iger Natriumhyaluronatlösung wie unter 2.1 beschrieben angemischt. Es entsteht dabei eine β -TCP Granula enthaltende DCPD-Matrix.

2.2.2 Brushite Zement ohne chronOS™ Granulaten

Bei diesem Zement wurden 12,57 g chronOS™ Inject Pulver ohne Granula mit 4,75 ml steriler 0,5%iger Natriumhyaluronatlösung ebenfalls wie in 2.1 beschrieben angemischt.

2.2.3. Kalziumsulfat

15 g Kalziumsulfat Hemihydrat Pulver wurden bei diesem Zement mit 4,12 g einer speziellen Kalziumsulfat Lösung vermischt.

2.2.4 Norian Reinforced

Norian Reinforced setzte sich aus 8,77 g sterilem Pulver welches aus α -Trikalziumphosphat (α -TCP), Kalziumkarbonat, Monokalziumphosphat Monohydrat (MCPM) und Synthetischen Fasern zusammen. Der Zement wurde mit einer speziellen flüssigen Komponente vermischt.

Aus patentrechtlichen Gründen kann die genaue Zusammensetzung der beiden letzten Zemente noch nicht bekannt gegeben werden. Sie liegen dem Autor jedoch vor und können gegebenenfalls überprüft werden.

2.3 Tiere

Bei dieser Studie wurden neun adulte (zwei Jahre alte), weibliche, Weiße Alpenschafe mit einem Gewicht von 47Kg bis 64Kg (Durchschnittlich: 55,5 Kg) eingesetzt. Das Intervall vom Operationstag zur Schlachtung betrug bei der ersten Gruppe zwei, bei der zweiten, vier und bei der dritten, sechs Monate. (Siehe Tab 2.3)

Tab 2.3

Schafnummer	Beobachtungszeitraum
2501	2 Monate
2502	2 Monate
2503	2 Monate
2504	4 Monate
2505	4 Monate
2506	4 Monate
2507	6 Monate
2508	6 Monate
2509	6 Monate

Das Tierexperiment wurde von der Kantonalen Tierversuchskommission des Bundesamtes für Veterinärwesen, Veterinäramt Zürich genehmigt und entsprechend der Gesetzgebung der Schweiz für den Tierschutz durchgeführt (Bewilligungsnummer: 81/2001).

2.3.1 Vorbereitung

Alle Tiere wurden einer Ankaufsuntersuchung, einer antiparasitären Behandlung mit Doramectin i.m. (0,2mg/kg; Dectomax; Pfizer AG, Zürich, Schweiz) und, um tragende Tiere von der Studie auszuschließen, bei negativen Ultraschallbefund einer zweimaligen intramuskulären Injektion von Dinoprost i.m. (1mg/Schaf Dinolytic; Pfizer AG, Zürich, Schweiz) im Abstand von 14 Tagen unterzogen. Zum Zeitpunkt des Ankaufs wurden die Tiere unter Quarantäne gehalten, dort wurde ihnen mit einem Vacutainer System (Bellvier Industrial Estate, Plymouth, GB) Blut entnommen und am virologischen Institut des Tierspitals der Universität Bern serologisch auf Maedi/Visna-Antikörper untersucht. Nur negative Tiere wurden in die Studie einbezogen. Des weiteren wurden die Tiere

geschoren, einer Klauenpflege unterzogen und mit bestandseigenen Ohrmarken gekennzeichnet. Bis kurz vor der Operation blieben die Tiere in einem großen Stall mit Weideauslauf. Dort wurde regelmäßige Klauenpflege und antiparasitäre Behandlung nach einem an die Befallssituation angepassten Behandlungsplan mittels Triclabendazol u. Levamisol p.o. (Endex 19,5%, 1ml/ 5Kg, Novartis AG Basel, Schweiz) sowie Ivermectin s.c (Ivomec, 0,25ml/ 25Kg, Biokema, Crissier- Lausanne, Schweiz) durchgeführt.

Eine Woche vor der Operation wurden die Schafe in einen näher gelegenen Stall gebracht. Dort wurde nochmals Blut entnommen, welches hämatologisch und blutchemisch untersucht wurde um Operationsrisiken auszuschließen. Die Schafe wurden 24 Stunden prä operationem gewogen, die Areale des Eingriffs geschoren und in eine mit Sägespäne eingestreute Box umgestellt wo sie freien Zugang zum Wasser hatten, jedoch kein Futter erhielten.

2.3.2 Operation

Am Operationstag wurden die Tiere noch einmal klinisch untersucht, bevor die Prämedikation mit Medetomidin i.m. (Domitor; 0,005mg/Kg; Gräub AG Bern, Schweiz) und Buprenorphin i.m.(Temgesic, 0,01mg/Kg, Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) durchgeführt wurde.

Nach 15 Minuten wurde den Tieren, im Operationssaal die am Vortag geschorene Halsseite mit Hibisrub-Seife gewaschen sowie mit 70% Alkohol und Hibitane Tinktur (Zeneca AG, Luzern, Schweiz) entfettet und desinfiziert. Ein venöser Zugang wurde mittels eines Verweilkatheters (Vygonüle S G14; Vygon GmbH; Aachen; Deutschland) in der Vena jugularis vorbereitet und ein IN-Stopper (Braun Melsungen AG; Deutschland) als Verschlussvorrichtung verwendet. Die Fixation des Katheters erfolgte mit einem nicht resorbierbaren Nahtmaterial (Supramid 2/0; Aesculap AG&Co, Tuttlingen, Deutschland).

Präoperativ wurde den Schafen eine Antibiose mit Benzylpenicillin i.v. (30000 I.U/Kg; Penicillin Natrium; G. Streuli AG, Uznach Schweiz) Gentamycin i.v (6mg/Kg; Vetagent, Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) verabreicht, zusätzlich das nichtsteroidale Antiphlogistikum und Analgeticum Carprofen (4mg/Kg Rimadyl; Pfizer Vertrieb Dr. Gräub AG, Bern, Schweiz). Equines Tetanusantitoxin s.c (3000 I.U/ Tier, Tetanus Serum Intervet; Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) wurde ebenfalls vor der Operation bei allen Versuchstieren angewendet.

Zur anschließenden Narkoseeinleitung wurden Ketamin i.v. (Narketan 10, 2mg/Kg, Vetoquinol AG, Bern, Schweiz und Diazepam i.v (Valium , Roche Pharma AG, Rheinach, Schweiz) verwendet.

Eine lokale Anästhesie des Kehlkopfes erfolgte mit einem Sprühstoß Lidocain (Xylocain Spray 10mg/Tier Asta Pharmaceutica AG; Dietikon, Schweiz) und zur anschließenden Intubation wurden Endotrachealtuben der Größen 11-14 verwendet. Die Anasthesie wurde mit 1-1,5% Isofluran (Forene, Abbott AG, Stans, Schweiz) und Sauerstoff aufrechterhalten. Zur kontinuierlichen, intraoperativen Blutdruckmessung wurde ein arterieller Ohrkatheter verwendet.

Die Bohrlochdefekte wurden sowohl im linken als auch im rechten proximalen und distalen Humerus und Femur gesetzt, wobei die Tiere intraoperativ gedreht und neu gelagert wurden. Der Zugang erfolgte bei Humerus (Tuberculum Majus, Condylus lat.) und Femur (Trochanter major, Condylus lat) von lateral. Über diesen Knochenpunkten wurde ein ca. fünf Zentimeter großer Hautschnitt vorgenommen und die Knochenareale wurden freipräpariert. Vor der Bohrung wurde das Periost über der geplanten Bohrstelle inzidiert und zur Seite geschoben. Mit einer luftdruckbetriebenen Bohrmaschine (Synthes, Oberdorf, Schweiz) und einem an der Spitze abgeflachten 8mm Bohrer wurden unter Wasserkühlung senkrecht zur Knochenachse zylindrische Defekte gesetzt. Durch eine Arretierung wurde immer die gleiche Eindringtiefe (13mm) gewährleistet (Fig. 2.3.1) [1]. Die Zubereitung der Zementpaste erfolgte während der Operation und wurde anschließend mit gleichmässigem Druck in die vorher gespülten

und getrockneten Bohrlöcher injiziert (Fig. 2.3.3). Eine Probe wurde niemals zweimal in die gleiche Lokalisation platziert. Nach Aushärtung der Zementproben wurde die Wunde in Schichten mit resorbierbarem Nahtmaterial und die Haut mit einem Skin-Stapler und mit sterilen Tupfern verschlossen. Die Tiere wurden 14 Tage lang postoperativ im Stall gehalten. Danach wurden sie, bis zu ihrer Schlachtung, wieder auf die Weide entlassen. Klammern und Tupfer wurde am 10. Tag nach der Operation entfernt.

3. Evaluation

3.1 Radiologische und mikroradiologische Evaluation

Die Knochen wurden unmittelbar nach der Schlachtung entnommen und Röntgenbilder wurden sowohl im medio-lateralen als auch im cranio-caudalen Strahlengang angefertigt (Faxitron X-ray System, Hewlett & Packard).

Die histologischen Proben für die Mikroradiographie wurden mit einer Dicke von 200 µm, quer zum Knochendefekt, mit einer Innenlochsäge (Leica SP 1600 Leica Instruments GmbH, Deutschland) geschnitten. Die Kontakt-Mikroradiographien wurden ebenfalls im Faxitron Röntgengerät mit einem hochauflösenden Film (X-OMAT MA Film, Kodak Film, France) aufgenommen. Bei der Evaluation wurde auf die Knochendichte und Knochenneubildung in der Peripherie des Bohrloches geachtet.

3.2 Makroskopische und histologische Evaluation

Die Knochendefekte werden mit der Knochensäge (EXACT, Norderstedt, Deutschland) parallel zur Längsachse des Bohrzylinders aus dem freipräparierten Knochen herausgeschnitten. Im Anschluss wurden Entzündungsreaktionen um die Zementprobe, Implantatsitz, Farb- oder Strukturveränderungen beurteilt.

Das frisch geschnittene Probematerial wurde in 4% Formalin für 7 Tage fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50, 75, 96%) entwässert und mit Xylol entfettet. Die Infiltration mit dem noch flüssigen Methylmetacrylat (MMA) erfolgte in einem Luft evakuierten Behälter bei 4°C. Zur Herstellung des Methylmetacrylats wurden Methacrylsäure-methylester (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Dibutylphthalat (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland) und Perkadox 16 (Dr. Grogg Chemie AG, Stetten, Schweiz) im Verhältnis 89.5: 10: 0.5 für 10 min in einem Magnetrührer gemischt. Danach wurden die Proben mit dem MMA zu schnittfertigen Probeblöcken polymerisiert. Für die histologischen und histomorphometrischen Auswertung wurden Dickschnitte (30-40 µm) und Dünnschnitte (5µm) hergestellt. Für die Anfertigung der Dickschnitte wurden von den Probenblöcken mit einer Innenlochsäge (Leica SP 1600 Leica Instruments GmbH, Deutschland) eine 200µm dicke Scheibe abgeschnitten mit einem Kunststoffkleber (Cementit, CA 12Merz+Beuteli Ag, Niederwangen, Schweiz) auf eine aus Acrylglas bestehende rechteckige Platte aufgeklebt und mit Hilfe einer Schleifmaschine (Struers Planopol-V) auf eine Dicke von 30-40 µm abgeschliffen.

Die Dünnschnitte wurden mit einem Schnittmikrotom (Leica Typ2500) angefertigt, auf einen Chromgelatine beschichteten Objektträger aufgezogen und mit einer Kisolfolie (Haska AG Bern, Schweiz) abgedeckt und für 2 Tage im Wärmeschrank bei 42° C getrocknet. Die Dünn- und Dickschnitte wurden jeweils mit Toluidin Blau gefärbt. Weiterhin wurden die Dünnschnitte noch mit der von Kossa Versilberung gefärbt und nach McNeal gegengefärbt. Beide Schnitte wurden im Anschluss lichtmikroskopisch bei verschiedenen Vergrößerungen beurteilt.

3.3 Histomorphometrie.

Die quantitative Auswertung der Zementresorption im zeitlichen Verlauf (2, 4, 6 Monate) erfolgte anhand histomorphomerischer Messungen (LEICA QWin). An den gefärbten Dickschnitten wurde bei einer Vergrößerung von 5,8x (Makroskop LEICA, M420) die Fläche der nicht resorbierten Zementmatrix, die neu gebildete Knochenmatrix, sowie der Anteil an Bindegewebe bzw. die Leerflächen zwischen den Knochentrabekeln und zwischen dem Zement und neuem Knochen gemessen. Mit Hilfe einer Software (Adobe Photoshop) war es möglich die gewünschten Flächen farblich zu kennzeichnen und anschließend automatisch berechnen zu lassen. Durch ein speziell für diesen Versuch entwickeltes Makro war es nicht nur möglich bestimmte Kreisflächen auszuwerten, sondern auch Ringflächen (Fig. 3.3.1 u. 3.3.2). Die drei Ringflächen mit jeweils aufsteigenden Radien ermöglichten eine bessere Auswertung im Hinblick auf den „schleichenden Ersatz“ des Zementes gegenüber den Kreisflächen[42].

3.4 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Computerprogramms (SPSS Version 11.0) ausgewertet, bei dem die Histomorphometriedaten mit einer faktoriellen Varianzanalyse geprüft wurde. Außerdem wurden aus den Ergebnissen der Histomorphometrie die Daten der deskriptiven Statistik wie Mittelwert und Standardabweichung errechnet. Als statistisch signifikant angesehen wurden p-Werte < 0.05.

4. Ergebnisse

4.1 Operation

Die Operation konnte bei allen neun Schafen komplikationslos durchgeführt werden. Das Einbringen der vier verschiedenen Zemente in die Knochendefekte gelang mit Hilfe der Applikationsspritzen mit Leichtigkeit. Die Zemente verdrängten im Defekt vorhandenes Blut ohne sich mit diesem zu vermischen. Blut sammelte sich in einigen Bohrlöchern an, obwohl diese sorgfältig mit einem Tupfer getrocknet worden waren. Die Zeit bis zum Aushärten war bei den verschiedenen Zementen unterschiedlich. Der Kalziumsulfat Zement härtete am schnellsten aus (2-3 Minuten) und zeigte eine relativ brüchige Konsistenz. Die Aushärtezeit der Brushite Zemente (Brushite, Brushite/Granules) war annähernd gleich und betrug ca. 10-12 Minuten. Diese Zemente wiesen eine glatte Oberfläche mit einer mehr elastischen Konsistenz auf. Norian Reinforced härtete mit etwa 13-15 Minuten am langsamsten aus. Dieser Zement fühlte sich relativ klebrig an und blieb oft an der Applikationsnadel kleben, was zur Blasenbildung im Zementdepot führen konnte. Aus diesem Grund wurde der Defekt sorgfältig von distal nach proximal aufgefüllt und die Nadel während der Zementinjektion aus dem Bohrloch gezogen.

Das Abrutschen des Bohrers bei Schaf 2502 führte dazu das Norian Reinforced anstatt in den rechten distalen Humerus, zweimal in den linken proximalen Humerus injiziert wurde.

4.2 Postoperative Phase

In der postoperativen Phase kam es zu keinen schwerwiegenden Komplikationen, so dass alle Tiere innerhalb der geplanten Zeitabstände geschlachtet werden konnten. Die meisten Schafe hatten in den ersten Tagen post operationem ge-

ringgradige Lahmheiten und Serombildungen, welche sich in allen Fällen innerhalb weniger Tage spontan zurückbildeten.

4.3 Radiologische Ergebnisse

Wie bei früheren Versuchen bewährte sich die Aufnahmetechnik der Knochen mit dem Faxitron Röntgengerät, welche eine detaillierte Evaluation der Röntgenbilder erlaubte. Der Abbau der Zemente über die Zeit konnte sehr gut aufgezeigt werden, wobei die Geschwindigkeit zwischen den Zementen unterschiedlich war. Auf den Röntgenbildern der Oberschenkelknochen im medio-lateralen Strahlengang wurde die Auswertung durch die Überlagerung von Femurkopf bzw. Hals mit dem Trochanter major erschwert. Die Lokalisation der Zementproben variierte geringfügig.

4.3.1 Brushite

Zwei Monate

Dieser Zement war oft als unregelmäßig runde Verschattung mit einer etwa 1mm breiten Aufhellung gesäumt. Des weiteren war in der Bohrlochperipherie eine sklerotische Verschattung zu erkennen (Fig. 4.3.1).

Vier Monate

In diesem Beobachtungszeitraum lagen nur noch ungefähr zwei Drittel des initialen Implantates vor, welche sich als kreisrunde Verschattung mit einer peripheren Aufhellungslinie darstellten. Die vormals sklerotische Zone verschwand und wurde durch eine breite verschattete und „trabekulär“ strukturierte Zone ersetzt. Mikroradiographisch konnte eine etwa 1-2 trabekeldicke Aufhellungszone um eine homogene Verschattung die von der Zementmatrix verursacht wurde erkannt werden (Fig. 4.3.3).

Sechs Monate

Hier konnte man den Anteil des residual Zementes als unregelmäßig geformte Verschattung erkennen welche teilweise nur noch ein Drittel des Bohrlochs einnahm. Das Bohrloch selbst war stellenweise nur noch schwer zu erkennen (Fig. 4.3.2). Mikroradiographisch waren zwiebelschalenartig, konzentrisch angeordnete Verschattungen unterschiedlicher Dichte zu erkennen (Fig 4.3.4).

4.3.2 Brushite/Granules

Zwei Monate

Insgesamt war das radiologische Erscheinungsbild dem des Brushite Zementes ohne Granula sehr ähnlich bis auf eine etwas kleinere oder gar nicht vorhandene sklerotische Zone an der Peripherie des Bohrlochs. Die Granula konnten radiologisch nicht als Einzelstrukturen identifiziert werden. Mikroradiographisch, jedoch erschien der Zement als inhomogene Verschattung.

Vier Monate und sechs Monate

Das röntgenologische Erscheinungsbild war dem des Brushite Zementes nahezu identisch, nur Mikroradiographisch, wie auch im ersten Beobachtungszeitraum erschien die Verschattung der Brushite/Granules Matrix als inhomogener im Vergleich zu Brushite (Fig. 4.3.5 u. 4.3.6)

4.3.3 Kalziumsulfat

Zwei Monate

Das Implantat bestand aus mehrschichtigen, kreisrunden Aufhellungszonen innerhalb des Bohrloches, welche ihrerseits wiederum von einem dünnen sklerotischen Saum umgeben waren (Fig. 4.3.7).

Bei betrachten der Mikroradiographischen Aufnahmen fielen die unterschiedlichen Ausprägungen der zentripetal verlaufenden trabekulären Strukturen auf. Es

wurde sowohl ein starkes als auch ein schwaches Trabekelwachstum im gleichen Beobachtungszeitraum verzeichnet (Fig. 4.3.8 u. 4.3.9).

Vier Monate

Kalziumsulfat war als unregelmäßige und inhomogene Aufhellung zu erkennen, welche mit trabekulär angeordneten Verschattungen durchzogen war.

Sechs Monate

Hier waren die Bohrlöcher nur als unregelmäßige Aufhellungen mit trabekulär angeordneten Verschattungen durchzogen zu erkennen. Insgesamt war der Prozess des Zementabbaus und Knochenaufbaus im Vergleich zur vier Monats Gruppe weiter fortgeschritten, das Bohrloch wurde immer schwerer vom umliegenden Knochengewebe abzugrenzen (4.3.10 u. 4.3.11).

4.3.4 Norian Reinforced

Zwei Monate

In der zwei Monate Gruppe war das Implantat als unregelmäßig runde Verschattung welche direkt mit dem Knochen in Kontakt stand zu erkennen. Mikroradiographisch fielen feine netzartige Aufhellungen in der Zementmatrix auf (Fig. 4.3.12).

Vier Monate

Das Implantat erschien im Vergleich zu den zwei Monate Proben insgesamt als etwas regelmäßiger, runder Verschattungsbereich welcher in Kontakt mit dem Knochengewebe stand. Die Ausgangsfläche des Implantates schien sich nur geringgradig verkleinert zu haben (Fig. 4.3.13).

Sechs Monate

Bei den Defekten der sechs Monate Gruppen konnten keine radiologischen Unterschiede zu den vier Monate Gruppen erkannt werden. Mikroradiographisch konnten aber bei manchen Präparaten vereinzelt, kleine spaltenartige Aufhellungen in der Zementmatrix gefunden werden (Fig. 4.3.14).

4.4 Makroskopische Ergebnisse

Alle Proben waren vom Periost überwachsen und zeigten keine Entzündungsreaktionen in den umgebenden Weichteilen. Bei der makroskopischen Beurteilung der in der Mitte durchgeschnittenen histologischen Blöcke zeigte sich, dass der Zement sich bei allen Proben gut eingefügt hatte. Es waren keine sichtbaren Luftblasen in den Zementanteilen vorhanden. Alle Zementproben zeigten periphere Resorptionszonen, die sich durch Farb- und Strukturveränderungen des Zementes bemerkbar machten. Der Zement floss nicht in das umliegende Gewebe ab. Makroskopische Unterschiede waren in dem Ausmaß der peripheren Resorptionszone in dem angrenzenden, normalen Knochen sichtbar. Kalziumsulfat wies die größte Reaktionszone gefolgt von den DCPD Zementen über die Zeit auf. Bei Norian Reinforced war zu keinem Zeitpunkt makroskopisch eine Reaktionszone erkennbar.

4.5 Histologische Ergebnisse

Die Dickschnitte eigneten sich gut für die histomorphometrische Flächenberechnung und der Ermittlung der Zementeigenschaften im Hinblick auf das Resorptionsverhalten (Art und Geschwindigkeit). Fig. 4.5 veranschaulicht die unterschiedlichen Resorptionsgeschwindigkeiten der geprüften Zemente.

Mit den Dünnschnitten konnte vor allem die zelluläre Beschaffenheit beurteilt werden. Da in der von Kossa/McNeal Färbung sich der kalzifizierte Knochen in unterschiedlichen Brauntönen anfärbt, eignet sich diese Färbung ausgezeichnet zur Beurteilung des neu gebildeten Knochens. Die Gegenfärbung mit McNeals Tetrachrome, bei der die Zellkerne dunkelblau und das Zytoplasma sowie das neu gebildete Osteoid türkis-blau erschienen, erlaubte eine detaillierte Evaluation der zellulären Zement Ab- und Knochen Aufbaumechanismen. Beim Anfer-

tigen der Dünnschnitte wurden oftmals Teile oder das ganze Implantat durch den Schneidevorgang herausgelöst. Dies beeinflusste jedoch nicht die qualitative Beurteilung der Schnitte, da die Übergangszone, sowie der Knochen selbst immer noch evaluiert werden konnten. In den Dünnschnitten wurden die Zellen und die Gewebsstrukturen in der Degradationszone sowie die neu gebildeten Knochenstrukturen evaluiert.

Die qualitative Auswertung der Dick- und Dünnschnitte ergab folgende Resultate:

4.5.1 Brushite

Zwei Monate

Der Grossteil des Defektes wurde von dem implantierten Brushite Zement ausgefüllt (Fig. 4.5.1). Vom Defektrand her bildete sich eine Reaktionzone (ca. 1-2 Trabekelbreiten) aus. Dort kam es zum Abbau der Zementmatrix, wobei in der Zone mit bräunlichem Material gefüllte Makrophagen nachweisbar waren (Fig. 4.5.9). Neugebildeter Knochen war hauptsächlich dem Defektrand angelagert. An den Zementresten angelagerte Osteoblastensäume bildeten Osteoid. Neben neu gebildeten Knochen füllte aber auch ein großer Anteil an mesenchymalen Gewebe den Raum zwischen Zement und Bohrlochrand aus.

Vier Monate

Nach vier Monaten hatte sich der verbliebene Zementrest deutlich reduziert. Die Matrix war zu einem großen Teil abgebaut und es erschienen zahlreiche, mit Fragmenten beladene Makrophagen. Der zentrale Teil bestand aus Zementresten, Makrophagen und wenigen inselartigen Stellen, die Knochengewebe enthielten (Fig. 4.5.10). Die Reaktionszone hatte sich gegenüber der zwei Monate Gruppe vergrößert (zwei Trabekelbreiten), wurde aber im Gegensatz zu Brushite/Granules mit eher mesenchymalen Gewebe ausgefüllt.

Sechs Monate

Die Implantate waren hier approximativ zu zwei Dritteln abgebaut. Im Zentrum des Bohrloches befand sich neben dem noch vorhandenen Residual Zement Mesenchymalgewebe mit plumpen und nur wenigen spindelförmigen Zellen. Des weiteren konnte man in dieser Zone auch vermehrt Knocheninseln erkennen, in deren Nähe sich mit Zementgranula beladene Makrophagen befanden.

Makrophagen waren zwar insgesamt nicht ganz so zahlreich wie nach zwei oder vier Monaten, aber immer noch häufig vorhanden. Weiter in der Peripherie fiel auf, dass mit Hilfe von Osteoklasten der Geflechtknochen in lamellären Knochen umgewandelt wurde und im gleichen Bereich immer noch Zementabbau durch Makrophagen statt fand (Fig. 4.5.11). In den Dickschnitten schien der Zementrest zwiebelschalenartig, kreisförmig geschichtet zu sein, wobei die Zementschichten von Knochengewebe umhüllt waren (Fig. 4.5.2).

4.5.2 Brushite/Granules

Zwei Monate

Der Grossteil des Defektes wurde von residualem Zement ausgefüllt. Vom Defektrand her bildete sich eine wellenförmige Reaktionszone aus (1-1,5 Trabekelbreiten) (Fig. 4.5.3, 4.5.12 u. 13). Dort kam es zum Abbau der Zementmatrix, wobei viele mit bräunlichem Material gefüllte Makrophagen nachweisbar waren (Fig. 4.5.14). Neugebildeter Knochen war hauptsächlich dem Defektrand aufgelagert. An den Zementresten angelagerte Osteoblastensäume bildeten Osteoid. Neben neu gebildeten Knochen füllte aber auch ein großer Anteil an wenig differenziertem fibrösem Gewebe den Raum zwischen Zement und Bohrlochrand aus. Die splitterförmig erscheinenden Granula (Fig. 4.5.3 u 4.5.4) wurden, wie die Brushite Matrix relativ rasch resorbiert. An ihrer Oberfläche konnte keine Knochenneubildung festgestellt werden.

Vier Monate

Nach 4 Monaten hatte sich der verbliebene Zementrest deutlich reduziert und die β -TCP Granula schienen sich räumlich verdichtet zu haben. Die Matrix war zum großen Teil durch die zahlreichen Makrophagen abgebaut worden. Es bildete sich eine große Reaktionszone (zwei Trabekelbreiten), die aus Zementresten, Makrophagen, wenigen schollenartigen Stellen mit Bildung meist unreifen Knochens und einem großen Anteil an bindegewebsartigem Gewebe bestand (Fig. 4.5.15). Selten waren Osteoklasten zu sehen, die am Übergang zwischen Zementresten und neu gebildeten Knochen angesiedelt waren.

Sechs Monate

Nach sechs Monaten war ein Grossteil der Zementmatrix abgebaut, so dass meist weniger als ein Drittel des Defektes noch mit Zementresten gefüllt war. Die Menge des neu gebildeten Knochens unterschied sich kaum von der vier Monate Gruppe. Der Unterschied bestand lediglich darin, dass weniger Osteoid von den Osteoblastensäumen produziert wurde und dass der randnahe Knochen

eine reifere Struktur aufwies. Makrophagen waren immer noch in großer Anzahl vorhanden, jedoch weniger als in den vorherigen Beobachtungszeiträumen. Selten konnten Fremdkörperzellen nachgewiesen werden. Ein großer Anteil des Defektes war mit bindegewebsartigem Gewebe gefüllt, welches eine besser geordnete Faserstruktur, als in den vorherigen Beobachtungszeiträumen, besaß (Fig.4.5.16). In den Dickschnitten erschien der Zementrest wie bei Brushite zwiebelschalenartig geschichtet. Die in der Zementmatrix verbleibenden β -TCP Granula wiesen abgerundete Kanten auf als in den vorherigen Beobachtungszeiträumen und schienen insgesamt weiter räumlich verdichtet (Fig. 4.5.5).

4.5.3 Kalziumsulfat

Zwei Monate

Nach zwei Monaten war die gesamte Zementmatrix bereits abgebaut. Ersetzt wurde diese teilweise durch ein mit Makrophagen durchsetztes, mesenchymales Gewebe und ein eher gefäßreiches Fettgewebe (Fig. 4.5.17 u. 18). Zahlreich traten seeförmig blaue Strukturen auf (Fig. 4.5.19). Vom Defektrand aus hatte sich lamellärer Knochen, welcher von Osteoblasten sowie Osteoklasten gesäumt war, in zentripetaler Richtung gebildet (Fig. 4.5.6 u. 4.5.20).

Vier Monate

Bei der vier Monate Gruppe wurde, meistens zentral, ein bindegewebsartiges Gewebe erkannt, welches nach außen hin von Fettgewebe ummantelt und durchsetzt mit Makrophagennestern war (Fig. 4.5.21). Im Vergleich zu dem vergangenen Beobachtungszeitraum erschienen die unterschiedlichen Gewebe viel strukturierter und mehr voneinander abgesetzt. Einsprossende Blutgefäße und blau gefärbte Lakunen waren kaum noch zu erkennen. Das Ausmaß der zentripetal ausgerichteten Knochentrabekel im Bohrloch war von Probe zu Probe verschieden. Die Menge an neu gebildeten Knochen unterschied sich aber kaum von der nach zwei Monaten.

Sechs Monate

Zu diesem Zeitpunkt waren kaum Unterschiede in der Struktur der Defekte gegenüber der vier Monate Gruppe zu erkennen, nur ein geringfügiges Wachstum an Knochengewebe hatte stattgefunden.

4.5.4 Norian Reinforced

Zwei Monate

In allen Dünnschnitten war Norian Reinforced während des Schneidevorgangs ausgebrochen und zum großen Teil auch am Rand herausgelöst. Der Durchmesser des vorhandenen Loches ließ aber darauf schließen, dass immer noch ein großer Anteil an Residual Zement vorhanden war. Vereinzelt blieb nur ein feiner dunkelvioletter Saum, der sich direkt an das Knochengewebe anschloss erhalten (Fig. 4.5.7 u. 4.5.22). Osteoklasten waren in relativ geringen Mengen zu erkennen (ca. ein Osteoklast/Powerfield).

Vier Monate

In der vier Monate Gruppe war der Zement ebenfalls aus den Schnitten herausgelöst. An den Rändern lagerte sich bei fast allen Proben ein dunkel-violetter Saum auf den neuen Knochen an. Von der schmalen, neuen Knochengrenze aus bildeten sich Knochenausstülpungen in zentripetaler Richtung (Fig. 4.5.23). Nur um den Defektrand herum entstand lamellärer Knochen mit neuen Osteonen. Oft traten im gleichen Bereich auch Osteoklasten in Erscheinung, die zwischen dem Zement und dem Knochen angesiedelt waren. Mit der Toluidin Blau Färbung erschienen in der zementnahen Knochenschicht unregelmäßig ovale Lumen welche mit perlschnurartig aufgereihten Osteoblasten ausgekleidet waren (Fig. 4.5.24). Häufig befanden sich in den kleineren Lumen auch Fremdkörperzellen in der Nähe einer im neu gebildeten Knochen eingelagerten Norian Faser. Ebenfalls zu sehen war Fettgewebe, welches sich in den trabekulären Strukturen des

spongiösen Knochens gebildet hatte. In den Dickschnitten waren die Norian Fasern auch zu erkennen.

Sechs Monate

In dieser Gruppe waren wiederum alle Zemente aus den histologischen Schnitten entfernt und es blieb nur noch ein Saum übrig der sich an den Knochen anschloss. Die Fläche des vorhandenen Loches und somit auch des Zementes hatte sich kaum verringert und war von unregelmäßig runder Form. Eine Reaktionszone war nicht vorhanden. Norian Fasern waren im Zement und im defektnahen Knochen zu erkennen, in der Peripherie jedoch nicht mehr (Fig. 4.5.25). Nur vereinzelt traten Makrophagen auf. Dem neu gebildeten Knochengewebe lagen Osteoklasten direkt auf (Fig. 4.5.26). Im Fettgewebe in Nähe des Knochengewebes und in kleinen Lakunen erschienen große Fremdkörperzellen. In den Dickschnitten waren die Norian Fasern besser zu erkennen als im vorangegangenen Beobachtungszeitraum (Fig. 4.5.8) ebenfalls traten vereinzelt Brüche in der Zementmatrix auf, in denen Knochengewebe einwuchs.

4.6 Histomorphometrische Ergebnisse der gesamten Kreisfläche

Die histomorphometrischen Messungen wurden einerseits auf die ganze Kreisfläche des Bohrloches bezogen und andererseits auf Ringflächen, welche die peripheren, mittleren und inneren Bezirke des ursprünglichen Bohrloches separat darstellen konnten. Da Ersatzmaterialien im Knochen in jedem Falle durch „schleichenden Ersatz“ ersetzt werden, konnte diese Messmethode die Geschwindigkeit des Knochenaufbaus darstellen[42].

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung der gesamten Kreisfläche sind der Tabelle 4.6 zu entnehmen.

4.6.1 Brushite

Bei Brushite nahm die Menge des residualen Zementes mit zunehmender Beobachtungsdauer signifikant ab ($p=0.00$). Über den gleichen Zeitraum hinweg nahmen der neu gebildete Knochen und das Knochenmark tendenziell zu. Bindegewebe wurde nur in der zwei Monate Gruppe detektiert ($p=0.05$). Bei den sechs Monate Gruppen fielen vor allem die hohen Standardabweichungen auf.

4.6.2 Brushite/Granules

Über den Versuchszeitraum hinweg nahm der residuale Zement kontinuierlich ab, während die Menge des neu gebildeten Knochens und Knochenmarks, über die Beobachtungsdauer insgesamt zunahm. Der Anteil an fibrösem Gewebe nahm zwischen dem zweiten und vierten Monat ab, jedoch zwischen dem vierten und letzten Monat wieder etwas zu, wobei auch bei dieser Gruppe die hohen Standardabweichungen auffielen.

4.6.3 Kalziumsulfat

Bei Kalziumsulfat wurde eine sehr deutliche Abnahme des Zementanteils über die Zeit beobachtet. Die Menge des neu gebildeten Knochens wies zwischen zwei und vier Monaten eine Zunahme, jedoch und zwischen vier und sechs Monaten wieder eine Abnahme auf. Dafür nahm die Knochenmarkmenge über den ganzen Zeitverlauf signifikant zu ($p=0.048$). Fibröses Gewebe hingegen nahm insgesamt über die komplette Beobachtungsdauer signifikant ab ($p=0.001$), wobei ebenfalls zwischen dem zweiten und vierten Monat signifikante Unterschiede festzustellen waren ($p=0.003$).

4.6.4 Norian Reinforced

Von allen Zementen wurde Norian reinforced am langsamsten abgebaut. Die Menge des residualen Zementes nahm mit zunehmender Beobachtungsdauer kaum ab. Der Anteil an Knochenmark nahm geringgradig zu. Auch der Anteil an neugebildeten Knochen nahm insgesamt im Beobachtungszeitraum leicht zu. Bindegewebsartiges Gewebe konnte zu keinem Zeitpunkt detektiert werden.

4.7 Histomorphometrische Ergebnisse der Ringfläche

Im Allgemeinen bestätigten sich die Eindrücke aus der qualitativen Auswertung. Auch hier zeigte sich, dass Kalzium Sulfat am schnellsten resorbiert und durch Knochen, Bindegewebe oder Knochenmark ersetzt wurde. Norian Reinforced zeigte im innersten Ring deutlich am wenigsten neuen Knochen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Ringflächen sind der Tabelle 4.7 zu entnehmen.

4.7.1 Brushite

Beim Brushite Implantat vollzog sich über den ganzen Beobachtungszeitraum ein Knochenmarkzuwachs in allen drei Ringen. Der Anteil an Zement blieb im äußeren Ring etwa gleich niedrig. In den beiden anderen Ringen war jedoch eine Abnahme über die Zeit zu beobachten. Bei der Knochenneubildung gab es im äußeren Ring nur eine Erhöhung zwischen dem zweiten und vierten Monat, jedoch wurde über die ganze Versuchsperiode beim mittleren und inneren Ring eine Mengenzunahme verzeichnet. Fibröses Gewebe erschien jeweils in allen Ringen nur in den ersten zwei Monaten.

4.7.2 Brushite/Granules

Im äußeren Ring blieb die Menge an neu gebildetem Knochen in den zwei, vier, und sechs Monate Gruppen etwa gleich, erfuhr aber in den anderen Ringen hingegen eine Steigerung. Beim Einsatz von Brushite /Granules nahm der Zementanteil in allen drei Ringen ab. Umgekehrt proportional kam es ebenfalls zu einer Zunahme von Knochenmark über die gesamte Beobachtungsdauer. Das fibröse Gewebe nahm bei allen drei Ringflächen zwischen dem zweiten und vierten Monat ab, steigerte sich aber im sechsten Monat wieder.

4.7.3 Kalziumsulfat

Der äußere und mittlere Ring zeigten über den Versuchszeitraum eine Mengenabnahme in Knochen, wobei der Knochenanteil im inneren Ring eher gleich blieb. Es konnte sowohl in allen Zeiträumen, als auch in allen Ringflächen kein Kalziumsulfat detektiert werden. Wie bei den zuvor beobachteten Gruppen nahm der Anteil an Knochenmark mit zunehmender Beobachtungsdauer zu. Die Menge an fibrösem Gewebe nahm über den Beobachtungszeitraum ab.

4.7.4 Norian Reinforced

Norian Reinforced verlor über den Beobachtungszeitraum im äußeren Ring ebenfalls Anteile an neu gebildetem Knochen, gewann jedoch insgesamt an Knochenmenge in den inneren Ringen. Der Zement nahm während dem Versuchsverlauf in dem äußeren Zirkel und dem mittleren Zirkel kaum ab, und blieb im inneren gleich. Auch hier nahm insgesamt der Anteil an Knochenmark mit zunehmender Beobachtungsdauer zu. Fibröses Gewebe konnte zu keinem Zeitpunkt detektiert werden.

4.8 Statistischer Vergleich der Zemente untereinander

Bei Kalziumsulfat bestand nach zwei Monaten, im inneren Ring signifikant mehr fibröses Gewebe als bei allen anderen Zementen ($p=0.00$) und signifikant weniger Zement ($p=0.00$).

Im mittleren Ring befand sich ebenfalls ein signifikant geringerer Anteil ($p=0.012$) an Zement bei Kalziumsulfat im Vergleich zu den anderen Gruppen. Nach sechs Monaten war der Anteil an residualem Zement bei Norian Reinforced in der inneren und mittleren Ringfläche signifikant ($p=0.00$) höher als bei den anderen Implantaten. Im gleichen Zeitraum konnte außerdem ein signifikanter Unterschied an Knochenmark zwischen Kalzium Sulfat und Brushite ($p=0.006$), Kalziumsulfat und Brushite/Granules ($p=0.016$) und Kalziumsulfat und Norian Reinforced ($p=0.00$), in der inneren Ringfläche, entdeckt werden.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die vier überprüften Zemente insgesamt eine gute Biokompatibilität, ein gutes Resorptionsverhalten aufwiesen und für eine gute Knochenneubildung sorgten, wobei sich die Geschwindigkeit der Zementresorption, des Knochenaufbaus und Herstellung des Knochenmarks im ursprünglichen Bohrloch deutlich voneinander unterschieden. Alle Zementtypen wurden durch das Prinzip des schleichenden Knochenersatzes (Creeping substitution) mit neuem Knochen ersetzt [42].

Der Kalziumsulfat Zement unterlag einer sehr schnellen Zementresorption, gefolgt von einer etwas variablen, aber doch insgesamt guten Knochenneubildung. Die Brushite Matrix wurde etwas weniger schnell als Kalziumsulfat resorbiert, aber doch deutlich schneller als Norian Reinforced.

Kalziumsulfat und die beiden Brushite Zemente wurden durch Makrophagen, Norian Reinforced vor allem durch Osteoklasten abgebaut.

Fremdkörperzellen wurden bei allen Zementtypen nur wenige beobachtet, was für eine ausgezeichnete Biokompatibilität aller vier getesteten Knochenzemente sprach.

5.1 Versuchsmodell

Um dem Testmodell für Knochenersatzmaterialien gerecht zu werden, wurden ausschließlich Schafe im Alter von zwei Jahren genutzt, da sie in diesem Alter als mehr oder weniger erwachsen betrachtet werden können. Darüber hinaus sind Schafe phylogenetisch hochstehende Tiere, die sowohl kostengünstig als auch mit der Knochenphysiologie des Menschen vergleichbar sind [43, 44]. Die Wahl der Beobachtungszeiträume beruhte auf den Resultaten von vorangegangenen Studien, die belegten, dass bei diesen Zeitabständen die wesentlichen Veränderungen und Vorgänge nach der Implantation erfasst wurden [1, 45]. Um ein Minimum an Tieren zu verwenden aber trotz allem genügend Daten für eine statistische Auswertung zu erhalten wurden die Schafe bilateral proximal und distal an Humerus und Femur operiert. Das Bohrlochmodell und die Lokalisation der Defekte wurden ebenfalls wegen ihrer geringen mechanischen Belastung, dem standardisierten, direkten Zugang, der spongiösen Knochenstruktur und der geringen Belastung für die Tiere ausgewählt. Wie bei früheren Versuchen hat sich dieses Tiermodell für die Untersuchung des Resorptionsverhaltens und der Biokompatibilität von Knochenzementen bewährt [40, 46].

Bei der Materialverarbeitung traten bei allen Zementen keine Probleme auf. Durch den Einsatz einer Mischmaschine bei allen Versuchszementen konnten immer die gleichen Zeitintervalle und Mischverhältnisse eingehalten werden. Unerwünschte Abriebverunreinigungen, wie beim manuellen Anmischen wurden dadurch vermieden [1].

Die Operationen wurden immer vom gleichen Operateur durchgeführt und verliefen größtenteils problemlos. Jedoch erwies sich das Ansetzen der Bohrhülse

an den distalen Femur und Humerus Kondylen als Herausforderung, da bei einer leichten Abweichung der genannten Lokalisation der Bohrlöcher der Bohrer leicht abrutschte und im Falle des distalen Humerus die Unversehrtheit des Ellenbogengelenkes auf dem Spiel stand.

Dies führte zu einer geringgradigen Varianz in der Bohrlochlokalisierung, hatte insgesamt aber keinen Einfluss darauf dass der Defekt immer in spongiösem Knochen angesiedelt war. Bei Schaf 2502 kam es zum Abrutschen des Bohrers im rechten distalen Humerus und um einer möglichen Humerusschaftfraktur aus dem Wege zu gehen wurde entschieden dort keinen weiteren Defekt zu setzen. Die oben beschriebenen chirurgischen Probleme sind zum jetzigen Zeitpunkt schwer lösbar, da der Einsatz einer Bohrschablone nicht möglich ist, weil es keine präzisen Orientierungspunkte zum Anlegen der Schablone gibt. Ob in naher Zukunft Computer chirurgische Methoden entwickelt werden, die ihren Einsatz mit einem guten Kosten-Nutzen Faktor legitimieren, wird sich zeigen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist vor allem die chirurgische Erfahrung ausschlaggebend.

5.2 Probenaufbereitung und Auswertung

Die postmortalen Röntgenbilder dienen der Ermittlung der Lokalisation und des Verhaltens des Zementimplantats im Knochen und um den Grad der Zementresorption zu begutachten. Die bei den Defekten sichtbaren radiologischen Struktur- und Dichteveränderungen wiesen auf die einsetzende und immer fortschreitende Zementresorption hin, die später sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch bestätigt wurde.

Bei der histologischen Aufbereitung der Knochenschnitte wurden Dick- und Dünnschnitte angefertigt. Für die Dickschnitte wurde eine Oberflächenfärbung mit Toluidin Blau gewählt. Mit dieser Färbung wurde die quantitative und qualitative Auswertung der Zementresorption und Knochenneubildung durchgeführt. Um Aussagen über das zelluläre Geschehen in der Defektzone machen zu kön-

nen, wurden histologische Dünnschnitte mit Toluidin Blau und von Kossa/McNeal gefärbt.

Eine objektive Methode die Zementresorption und Knochenneubildung zu quantifizieren ergab sich in der computergestützten Bildanalyse. Die mit Toluidin Blau gefärbten Dickschnitte hatten jedoch das Problem, dass sich die Zementmatrix und das Knochengewebe in ähnlichen Blautönen darstellten. Dadurch wurde die Detektion der verschiedenen Phasen, seitens des Computerprogramms, erschwert und sorgte für Fehlerquellen. Um dem entgegenzuwirken wurden die Präparate mit dem Makroskop bei einer Vergrößerung von $\times 5,8$ in den Computer eingelesen und die einzelnen Komponenten mit Hilfe einer Computersoftware (Adobe Photoshop) farblich nachbearbeitet. Da die Bohrlöcher bei der Probenaufbereitung geringe Unterschiede in der Schnittebene, welche exakt 90° zu der Achse des ursprünglichen Bohrlochs sein sollte, hatten und damit auch die Durchmesser variierten, entstanden geringe histomorphometrische Mess-Schwankungen welche ihrerseits wiederum zu den Standardabweichungen in der statistischen Auswertung beitrugen. Da es sich bei diesem Versuch aber um ein biologisches Versuchssystem handelt bei dem geringe Mess-Schwankungen unumgänglich sind, könnte eine Verbesserung der statistischen Ergebnisse nur durch eine Erhöhung der Versuchstieranzahl erreicht werden. Da dies aber aus tierschutzrechtlichen Gründen nicht machbar ist, konnten nur schwer präzisere Ergebnisse erzielt werden.

5.3 Ergebnisse

In zahlreichen Studien ist die Zell-medierte Resorption von Knochenzementen beschrieben worden [1, 39, 47]. Je nach Zementtyp unterscheidet sich die Art, der beteiligten Zellen. Bei schnell resorbierbaren Zementen sind Makrophagen und Riesenzellen am Resorptionsprozeß beteiligt [48]. Bei langsam resorbierten Zementen sind Osteoklastartige Zellen für den Abbau verantwortlich [49].

Diese Studie hat gezeigt, dass die vier überprüften Zemente insgesamt eine gute Biokompatibilität, ein gutes Resorptionsverhalten und für eine gute Knochenneubildung sorgten. Im Vergleich zueinander, waren jedoch deutliche Unterschiede in der Art und Geschwindigkeit der Zementresorption zu erkennen.

Die Handhabung der Zemente unter intraoperativen Bedingungen erwies sich als weitgehend problemlos. Durch die Zementapplikation mittels Spritze konnten die Defekte retrograd befüllt und damit einerseits der Einschluss von Luft weitgehend verhindert, andererseits ein direkter Kontakt des implantierten Zementes mit der knöchernen Defektgrenze erreicht werden. Die Aushärtezeit des Kalziumsulfates war kurz (< 4 Minuten) und ließ dem Chirurgen nur wenig Zeit bis zur Injektion. Durch Hinzufügen einer verzögernden Komponente könnte die Aushärtezeit verlängert und somit die Anwendbarkeit von Kalziumsulfat verbessert werden.

Die Zementresorptionsgeschwindigkeit verhielt sich proportional zu ihrer Aushärtezeit. Mit anderen Worten Kalzium Sulfat wurde am schnellsten resorbiert, gefolgt von den zwei Brushite Zementformulierungen und Norian reinforced.

Im Allgemeinen gilt, dass ein Knochenzement in gleichem Maße resorbiert werden soll wie die Knochenneubildung voranschreitet. Es stellt sich jedoch die Frage, ob ein Zement als schlecht bewertet werden kann, weil er schnell abgebaut wird. Vielmehr ist das Einsatzgebiet des Zementes ausschlaggebend. Kalziumsulfat könnte als Trägersubstanz für Antibiotika oder Wachstumsfaktoren eingesetzt werden, da in diesem speziellen Falle eine relativ schnelle Resorption und Molekül-release hilfreich und die mechanische Stabilität von untergeordneter Bedeutung ist [4]. Brushite Zemente wie zum Beispiel chronOs Inject™ werden erfolgreich in Kombination mit Osteosynthesematerialien eingesetzt [47]. Bei Kranioplastiken hingegen ist es wichtig dass der Zement eine hohe mechanische Belastbarkeit aufweist, wofür sich Apatitzemente wie Norian Reinforced wiederum sehr gut eignen würden [47, 50]. Eine Aussage über mechanische Belastbarkeit konnte in dieser Studie nicht gemacht werden, da dieses Ver-

suchsmodell nicht dafür ausgelegt war und es auch nicht Bestandteil der Fragestellung war. In einem ersten Schritt sollten vor allem Fragen der Biokompatibilität geklärt werden. Deshalb wurde bewusst ein Tiermodell ausgewählt, welches die Zemente nicht zusätzlich auch noch biomechanischen Belastungen aussetzen sollte. Diese Fragen sollen in einem nächsten Schritt mit einem anderen Tiermodell geprüft werden (Defektheilung im Knochenschaft). Ikenaga et al. aber fand heraus dass nach 12 Wochen die Druckfestigkeit eines Brushite Zementes größer als der von spongiösem Knochen war. Jedoch nahm dieser Wert nach 16 Wochen ab [51]. Hingegen zeigten die Apatitzementproben einer anderen biomechanischen Studie bis 16 Wochen gleich bleibende mechanische Eigenschaften, die genauso groß oder sogar größer waren als die des trabekulären Knochens [49].

Kalziumsulfat wurde schon nach zwei Monaten vollständig resorbiert und durch fibröses Gewebe ersetzt, welches aber gleichzeitig durch einen hohen Anteil an maturem Knochen mit zentripetal gerichteten Trabekeln durchzogen war. Das Ausmaß und die Größe der einwachsenden Trabekel standen weniger mit dem zeitlichen Verlauf des Versuches in Zusammenhang sondern eher mit der Trabekeldichte des umliegenden spongiösen Knochens. Insgesamt ist das relativ hohe Knochenwachstum wahrscheinlich durch die Abgabe von Ca-Ionen zur Bildung eines osteoblastophilen Milieus zu erklären [21, 52]. Bei der histologischen Betrachtung von Kalziumsulfat, vielen vereinzelt seeförmige Strukturen auf, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Reste der flüssigen Komponente des Zementes darstellten. Sowohl Brushite und Brushite/Granules zeigten nach vier Monaten eine etwa ein bis zwei trabekeldicke Schicht aus mesenchymalen- bzw. fibrösen Gewebe in der Resorptionszone, in Kombination mit einer hohen Anzahl von Zement beladenen Makrophagen. Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der Homöostase der Knochenneubildung und Resorption. Sie werden ebenfalls als Osteoklastenvorläuferzellen diskutiert [53]. In vivo und in vitro wurde ihre Phagozytosekapazität für Kalziumphosphatpartikel beschrieben [54,

55]. Das Auftreten von Makrophagen beim zell-medierten Abbau führt nicht zu einer verzögerten Knochenneubildung [39]. Vielmehr muss das Auftreten von Makrophagen bei schnell resorbierbaren Kalziumphosphatzementen als normale Reaktion, nach dem Prinzip des „schleichenden Ersatzes“, bei dieser Zementgruppe diskutiert werden [42]. Der bereits von anderen Untersuchern beobachtete positive Einfluss von in die Zementmatrix eingebetteten kugelförmigen β -TCP Granula auf die Osteokonduktion und Nidus- oder Kristallisations- Bildung konnte in diesem Versuch bei den fragmentartigen β -TCP Granula nicht beobachtet werden [41, 56]. Zwar schienen die fragmentartigen β -TCP Granula langsamer abgebaut zu werden als der Rest der Matrix, sie fungierten aber nicht als so genannte „Knochenanker“ wie die kugelförmigen β -TCP Granula. Ob nun die Qualität (Größe und Dichte) oder die Form der β -TCP Granula dafür ausschlaggebend sind, ist wahrscheinlich nur durch einen eigenständigen Versuch, indem beide Granulaformen, auch in verschiedenen Größen miteinander verglichen werden, zu beantworten. Theiss et al.[39] beschrieben im Unterschied zu dieser Studie einen 75% Abbau des chronOs Inject Zementes schon nach 2 Monaten. Einen gleich schnellen Zementabbau, wie in dieser Studie hingegen beschrieben Apelt et al und Kümmerle et al.[1, 47], die erst einen 75% Zementabbau nach 6 Monaten erreichten.

Ein anderes Bild hingegen zeigte Norian Reinforced. Der Zement wurde auch nach sechs Monaten nur in geringem Maße resorbiert und die Kontaktzone zeigte nur vereinzelt das Auftreten eines zellvermittelten Abbaus [36, 49]. Ab dem vierten Monat jedoch konnten die synthetischen Norian Reinforced Fasern in kleinen Lakunen im Knochengewebe erkannt werden. Sie befanden sich hauptsächlich in der Kontaktzone und wurden vereinzelt durch Fremdkörperzellen begleitet.

Im Gegensatz zu der Studie von Apelt et al.[1] zerbrach Norian Reinforced nicht in Polygonale Schollen wie Norian SRS, sondern es entstanden zwar Risse in der Zementmatrix jedoch war der Zusammenhalt der gesamten Masse meistens

gegeben. Wahrscheinlich wurde der bessere Zusammenhalt der Matrix durch die enthaltenden Norian Fasern bewirkt. Ob eine verbesserte mechanische Stabilität, durch die hinzugefügten Fasern entstanden sind, konnte mit diesem Versuchsmodell nicht erörtert werden. Die erst ab dem vierten Monat im Knochengewebe auftretenden, bzw. sichtbaren Fasern sind dadurch zu erklären, dass diese Fasern langsamer abgebaut werden als der sie umgebende Zement und sich dadurch neuer Knochen um die Fasern bilden kann. Die vernachlässigbare Anzahl an Fremdkörperzellen, die manche Fasern begleiten, ist zu gering um negative Auswirkungen auf die Biokompatibilität des Zementes zu haben [57, 58].

6. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Studie wurden vier verschiedene Zementformulierungen auf ihre Biokompatibilität und Resorption hin in acht unterschiedlichen Defektlokalisationen über einen Zeitraum von zwei, vier und sechs Monaten im Schafmodell untersucht. Alle Zemente erwiesen sich als gut biokompatibel, gut resorbierbar und besaßen eine gute Knochenneubildungsrate. Kalziumsulfat zeigte eine sehr variable Knochenneubildung. Der Brushite Zement besaß gegenüber dem Brushite/Granules Zement, keine Vorteile außer den geringeren Materialkosten. Beide zeigten auch weniger gute Eigenschaften als der bereits kommerziell erhältliche chronOs™ Inject, der aufgrund seiner für Knochenneubildung optimalen Struktur der β -TCP Granula eine deutlich kleinere Resorptionszone zwischen Zement und Knochen und ebenfalls weniger Bindegewebe aufwies. Norian Reinforced verhielt sich zementtypisch und die geringgradigen Fremdkörperreaktionen sind als vernachlässigbar anzusehen. Die langsamere Resorption des Zementes bedingt hingegen eine andere Indikation für die chirurgische Applikation im Vergleich zu den schneller resorbierbaren Zementtypen.

Es wurde die Schlussfolgerung gezogen dass die positive oder negative Beurteilung von Zementeigenschaften abhängig von der medizinischen Indikationsstel-

lung gemacht werden muss. Somit können durch sorgfältiges Erarbeiten von speziellen Einsatzgebieten im Knochen vorerst erscheinende Nachteile zu Vorteilen umgewandelt werden.

7.Literaturverzeichnis

1. Apelt, D., et al., *In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements*. Biomaterials, 2004. **25**(7-8): p. 1439-51.
2. Carinci, F., et al., *Calcium sulfate: analysis of MG63 osteoblast-like cell response by means of a microarray technology*. J Biomed Mater Res, 2004. **71B**(2): p. 260-7.
3. Cassidy, C., et al., *Norian SRS cement compared with conventional fixation in distal radial fractures. A randomized study*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A**(11): p. 2127-37.
4. Damien, C.J. et al., *Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications*. J Appl Biomater, 1991. **2**(3): p. 187-208.
5. Brown WE, et al., *Dental Restorative Cement Pastes, US Patent Number : 4518430*. American Dental Association Health, 1985.
6. Gazdag, A.R., et al., *Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications*. J Am Acad Orthop Surg, 1995. **3**(1): p. 1-8.
7. Bauer, T.W. et al., *Bone graft materials. An overview of the basic science*. Clin Orthop Relat Res, 2000(371): p. 10-27.
8. Garg, M., et al., *Early biologic behavior of bone grafts. A fine needle aspiration cytology study*. Acta Cytol, 1997. **41**(3): p. 765-70.
9. Gerngross, H., et al., *[Complications at removal sites of autologous cancellous bone transplants]*. Aktuelle Traumatol, 1982. **12**(3): p. 146-52.
10. Younger, E.M. et al., *Morbidity at bone graft donor sites*. J Orthop Trauma, 1989. **3**(3): p. 192-5.
11. Grogan, D.P., et al., *Use of allograft bone for posterior spinal fusion in idiopathic scoliosis*. Clin Orthop Relat Res, 1999(369): p. 273-8.
12. Friedlaender, G.E., *Bone-banking*. J Bone Joint Surg Am, 1982. **64**(2): p. 307-11.
13. Young, C., et al. *A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999. **14**(1): p. 72-6.
14. Berglundh, T. et al., *Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog*. Clin Oral Implants Res, 1997. **8**(2): p. 117-24.
15. Chan, C., et al., *Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2002. **31**(1): p. 73-7.
16. Hench, L.L. et al., *Third-generation biomedical materials*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1014-7.
17. Jarcho, M., *Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics*. Clin Orthop Relat Res, 1981(157): p. 259-78.
18. Hollinger, J.O. et al., *Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics*. Clin Orthop Relat Res, 1986(207): p. 290-305.
19. Middleton, J.C. and A.J. Tipton, *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2335-46.
20. Heckman, J.D., et al., *Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor-beta enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer*. J Bone Joint Surg Am, 1999. **81**(12): p. 1717-29.
21. Hadjipavlou, A.G., et al., *Plaster of Paris as an osteoconductive material for interbody vertebral fusion in mature sheep*. Spine, 2000. **25**(1): p. 10-5; discussion 16.
22. Stubbs, D., et al., *In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in a rabbit tibial defect model*. Biomaterials, 2004. **25**(20): p. 5037-44.

23. Rauschmann, M.A., et al., *Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections*. Biomaterials, 2005. **26**(15): p. 2677-84.
24. Brown W.E., et al., *Dental Restorative Cement Pastes*. American Dental Association Health, 1985. **Patent Number:4518430**.
25. Bohner, M., *Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements*. Injury, 2000. **31 Suppl 4**: p. 37-47.
26. Bohner, M., et al., *Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement*. J Mater Sci Mater Med, 2000. **11**(2): p. 111-6.
27. Bohner, M., et al., *In vitro aging of a calcium phosphate cement*. J Mater Sci Mater Med, 2000. **11**(3): p. 155-62.
28. Miyamoto, Y., et al., *In vivo setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement*. Biomaterials, 1995. **16**: p. 855-860.
29. Lacout, J.L., et al., *Crystallization mechanisms of calcium phosphate cement for biological uses*. J Mater Sci Mater Med, 1996. **110**: p. 371-374.
30. Tampieri, A., et al., *From biomimetic apatites to biologically inspired composites*. Anal Bioanal Chem, 2005.
31. Tampieri, A., et al., *Biologically inspired synthesis of bone-like composite: self-assembled collagen fibers/hydroxyapatite nanocrystals*. J Biomed Mater Res A, 2003. **67**(2): p. 618-25.
32. Monma H., et al., *Effect of additives on hydration and hardening of tricalcium phosphate*. Gypsum Lime, 1984(188): p. 11-16.
33. Fernandez, E., et al., *High-strength apatitic cement by modification with superplasticizers*. Biomaterials, 2005. **26**(15): p. 2289-96.
34. Fadeeva, I.V., et al., *Apatite formation in the reaction-setting mixture of Ca(OH)₂-KH₂PO₄ system*. J Biomed Mater Res A, 2004. **70A**(2): p. 303-8.
35. Eggli, et al., *Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution*. Clin Orthop Relat Res, 1988(232): p. 127-38.
36. Constantz, B.R., et al., *Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites*. J Biomed Mater Res, 1998. **43**(4): p. 451-61.
37. Constantz, B.R., et al., *Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone*. Science, 1995. **267**(5205): p. 1796-9.
38. Lu, J., et al., *The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone*. J Biomed Mater Res, 2002. **63**(4): p. 408-12.
39. Theiss, F., et al., *Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement*. Biomaterials, 2005. **26**(21): p. 4383-94.
40. Ohura, K., et al., *Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study*. J Biomed Mater Res, 1996. **30**(2): p. 193-200.
41. Bohner, M., et al., *Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system*. J Pharm Sci, 1997. **86**(5): p. 565-72.
42. Phemister, D.B., *The fate of Transplanted Bone and Regenerative Power of its various Constituents*. Surgery, Gynecology and Obstetrics, 1914. **19**: p. 303-333.
43. Lippuner, K., et al., *Effect of animal species and age on plate-induced vascular damage in cortical bone*. Arch Orthop Trauma Surg, 1992. **111**(2): p. 78-84.
44. Nunamaker, D.M., *Experimental models of fracture repair*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S56-65.

45. Oberle, A., et al., *[Investigation about the clinical use of brushite- and hydroxylapatite-cement in sheep]*. Schweiz Arch Tierheilkd, 2005. **147**(11): p. 482-90.
46. Flautre, B., et al., *Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep*. Bone, 1999. **25**(2 Suppl): p. 35S-39S.
47. Kuemmerle, J.M., et al., *Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty - an experimental study in sheep*. J Craniomaxillofac Surg, 2005. **33**(1): p. 37-44.
48. Ooms, E.M., et al., *Trabecular bone response to injectable calcium phosphate cement*. J Biomed Mater Res, 2002. **61**(1): p. 9-18.
49. Frankenburg, E.P., et al., *Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement*. J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(8): p. 1112-24.
50. Moreira-Gonzalez, A., et al., *Clinical Outcome in Cranioplasty: Critical Review in Long-Term Follow-Up*. J Craniofac Surg, 2003. **14**: p. 144-153.
51. Ikenaga, M., et al., *Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics*. J Biomed Mater Res, 1998. **40**(1): p. 139-44.
52. Thomas Dmd, M.V., et al., *Calcium sulfate: a review*. J Long Term Eff Med Implants, 2005. **15**(6): p. 599-607.
53. Lassus, J., et al., *Macrophage activation results in bone resorption*. Clin Orthop Relat Res, 1998(352): p. 7-15.
54. Malard, O., et al., *Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study*. J Biomed Mater Res, 1999. **46**(1): p. 103-11.
55. Pioletti, D.P., et al., *The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions*. Biomaterials, 2000. **21**(11): p. 1103-14.
56. Flautre, B., et al., *Bone colonization of beta-TCP granules incorporated in brushite cements*. J Biomed Mater Res, 2002. **63**(4): p. 413-7.
57. Ruuskanen, M., et al., *Evaluation of self-reinforced polyglycolide membrane implanted in the subcutis of rabbits*. Ann Chir Gynaecol, 1999. **88**(4): p. 308-12.
58. Barber, F.A. et al, *The in vivo histology of an absorbable suture anchor: a preliminary report*. Arthroscopy, 1995. **11**(1): p. 77-81.

8. Anhang

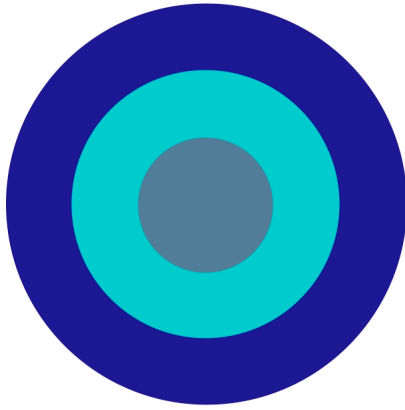


Fig. 3.3.1

Das speziell entwickelte Makro ermittelt die Fläche an Zementmatrix, neu gebildeter Knochenmatrix, den Anteil an Bindegewebe und den Leerflächen zwischen den Knochentrabekeln in 3 verschiedenen Ringflächen in einem Aufsteigenden Radius:

Innere Ringfläche (grau), mittlere Ringfläche (türkis) und äußere Ringfläche (blau).

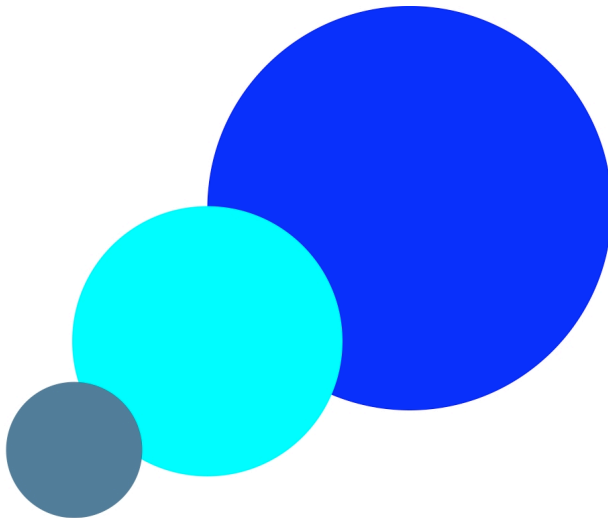


Fig. 3.3.2

Das selbe Makro misst auch die Fläche an Zementmatrix, neu gebildeter Knochenmatrix, den Anteil an Bindegewebe und den Leerflächen zwischen den Knochentrabekeln in 3 verschiedenen Kreisflächen:

Innere Kreisfläche (grau), mittlere Kreisfläche (türkis) und äußere Kreisfläche (blau).

Tab. 4.6 Die Werte repräsentieren die prozentualen Anteile der Fläche von neu gebildeten Knochen, Zementresten, Bindegewebe und Knochenmark.

	Gruppe	Knochen%	Zement%	Bindegew.%	Knochenm.%
	2 Monate	45.51 ± 17.33	26.17 ± 6.83	3.11 ± 4.06	25.19 ± 14.61
Brushite	4 Monate	48.51 ± 10.66	23.95 ± 7.57	0.00 ± 0.00	27.42 ± 6.42
	6 Monate	59.70 ± 14.65	3.42 ± 3.66	0.00 ± 0.00	37.43 ± 16.45
	2 Monate	41.99 ± 15.76	28.67 ± 10.20	1.88 ± 1.81	27.45 ± 14.24
Brushite/Granula	4 Monate	42.80 ± 11.15	17.88 ± 5.34	0.00 ± 0.00	38.90 ± 12.57
	6 Monate	49.51 ± 16.11	11.09 ± 16.28	5.94 ± 13.29	38.99 ± 9.41
	2 Monate	51.03 ± 12.50	0.00 ± 0.00	16.80 ± 10.76	32.15 ± 12.74
Kalzium Sulfat	4 Monate	43.29 ± 25.71	0.00 ± 0.00	0.16 ± 0.40	56.53 ± 25.81
	6 Monate	32.84 ± 13.77	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	67.15 ± 13.77
	2 Monate	34.59 ± 20.32	41.04 ± 13.24	0.00 ± 0.00	24.34 ± 15.06
Norian Reinforced	4 Monate	25.67 ± 9.63	42.94 ± 8.73	0.00 ± 0.00	31.37 ± 6.46
	6 Monate	35.42 ± 12.74	32.50 ± 9.29	0.00 ± 0.00	32.07 ± 6.06

Tab. 4.7 Die Werte repräsentieren die prozentualen Anteile der Ringflächen von neu gebildeten Knochen, Zementresten, Bindegewebe und Knochenmark.

	Zeit	Gruppe	Knochen%	Zement%	Bindegew.%	Knochenm.%
AR	2Monate	Brushite	63.56± 25.11	0.02± 0.03	0.33±0.58	36.07± 24.57
		Brushite/Granules	56.81± 24.32	1.30± 2.97	0.21± 0.32	41.66± 23.35
		Kalziumsulfat	55.92± 15.42	0.00± 0.00	1.89± 2.25	42.10± 13.94
		Norian Reinforced	53.38± 27.22	11.73± 7.90	0.00± 0.00	34.87± 21.43
	4Monate	Brushite	64.39± 13.90	2.42± 4.80	0.00± 0.00	33.17± 11.41
		Brushite/Granules	50.79± 16.75	3.23± 7.69	0.00± 0.00	45.97± 15.22
		Kalziumsulfat	42.10± 23.41	0.00± 0.00	0.00± 0.00	57.89± 23.42
		Norian Reinforced	41.11± 12.90	9.59± 4.87	0.00± 0.00	49.28± 13.83
	6Monate	Brushite	59.44± 20.84	0.32± 0.57	0.00± 0.00	40.23± 20.49
		Brushite/Granules	50.62± 13.91	0.21± 0.41	1.75± 3.92	47.40± 15.46
		Kalziumsulfat	34.38± 10.49	0.00± 0.00	0.00± 0.00	65.61± 10.49
		Norian Reinforced	45.16± 10.37	8.13± 7.79	0.00± 0.00	46.69± 5.67
MR	2Monate	Brushite	30.25± 12.88	48.05± 18.11	8.34± 11.21	13.33± 9.98
		Brushite/Granules	31.01± 18.21	51.39± 25.88	3.97± 3.81	12.30± 7.47
		Kalziumsulfat	51.55± 16.61	0.00± 0.00	26.02± 21.34	22.41± 15.81
		Norian Reinforced	13.24± 18.01	72.99± 28.05	0.00± 0.00	13.75± 15.44
	4Monate	Brushite	40.23± 16.83	33.70± 19.33	0.00± 0.00	26.05± 6.20
		Brushite/Granules	39.05± 21.60	29.65± 20.42	0.00± 0.00	31.28± 13.09
		Kalzium Sulfat	46.59± 27.12	0.00± 0.00	0.33± 0.81	53.07± 27.36
		Norian Reinforced	18.87± 21.52	71.50± 26.35	0.00± 0.00	9.62± 6.41
	6Monate	Brushite	60.41± 14.31	6.52± 12.26	0.00± 0.00	33.05± 14.80
		Brushite/Granules	50.09± 17.80	7.60± 7.41	9.88± 22.09	32.42± 15.32
		Kalziumsulfat	40.29± 20.73	0.00± 0.00	0.00± 0.00	59.69± 20.73
		Norian Reinforced	26.54± 12.66	53.40± 25.13	0.00± 0.00	20.04± 13.30
IR	2Monate	Brushite	0.24±0.48	92.54± 8.06	1.28± 2.56	5.92± 7.87
		Brushite/Granules	0.02± 0.06	98.69± 1.77	0.01± 0.03	1.26± 1.79
		Kalziumsulfat	24.27± 20.12	0.00± 0.00	64.54± 27.65	11.15± 8.34
		Norian Reinforced	4.02± 8.99	92.83± 13.95	0.00± 0.00	3.14± 5.04
	4Monate	Brushite	1.08± 2.46	87.12± 14.08	0.00± 0.00	11.79±14.29
		Brushite/Granules	3.26± 3.69	85.47± 12.61	0.00± 0.00	11.25± 10.85
		Kalziumsulfat	39.35± 41.56	0.00± 0.00	0.50± 1.23	60.14± 42.36
		Norian Reinforced	11.88± 13.35	82.20± 18.17	0.00± 0.00	5.90±5.88
	6Monate	Brushite	43.13±23.95	24.28± 29.39	0.00± 0.00	32.57± 13.24
		Brushite/Granules	34.76± 22.58	15.44± 22.94	15.28±34.16	34.50± 17.52
		Kalziumsulfat	14.25± 7.28	0.00± 0.00	0.00± 0.00	85.74± 7.28
		Norian Reinforced	4.76± 6.32	85.96± 19.13	0.00± 0.00	9.24± 13.06

Fig. 2.1.1-2.1.4 Zementvorbereitung

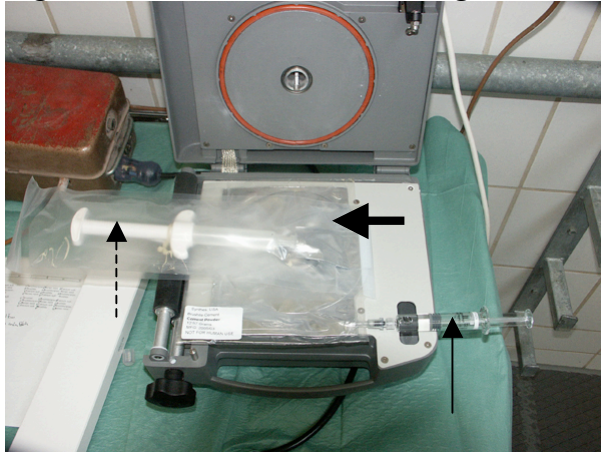


Fig. 2.1.1

*Ein eigenes Mixing-Kit wurde für alle Versuchszemente entwickelt bestehend aus einer **festen**(dicker Pfeil) und **flüssigen** (dünner Pfeil) Komponente und einer **Applikations-spritze** (gestrichelter Pfeil).*



Fig. 2.1.2

Nach Injektion der flüssigen Komponente konnte mit dem Mischvorgang begonnen werden.



Fig. 2.1.3

Bei Erreichen der vorgeschriebenen Mischumdrehungen konnte der Zement in die Applikations-spritze gedrückt werden.

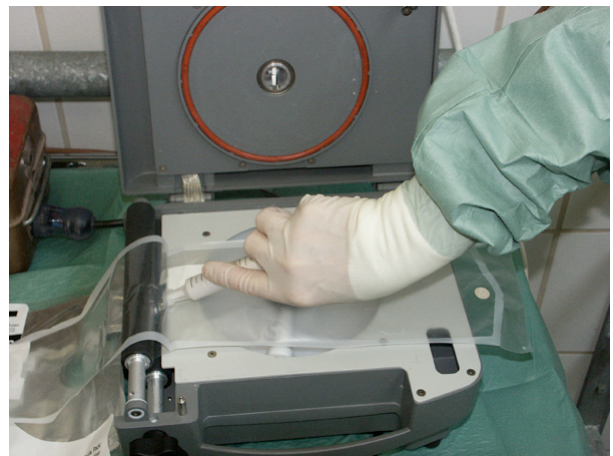


Fig. 2.1.4

Entnahme der Applikations-spritze durch den Chirurgen.

Fig. 2.3.1-2.3.4 Operation

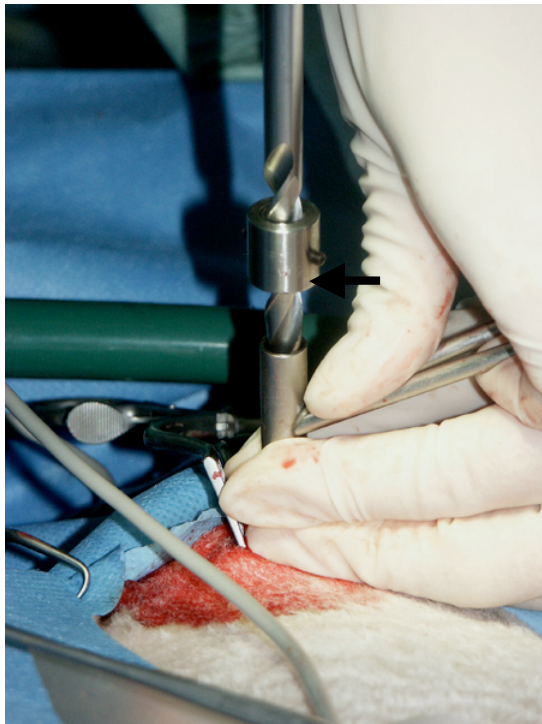


Fig. 2.3.1

*Das Bild zeigt die **Arretierung**, die ein 13mm tiefes Bohrloch gewährleistete.*

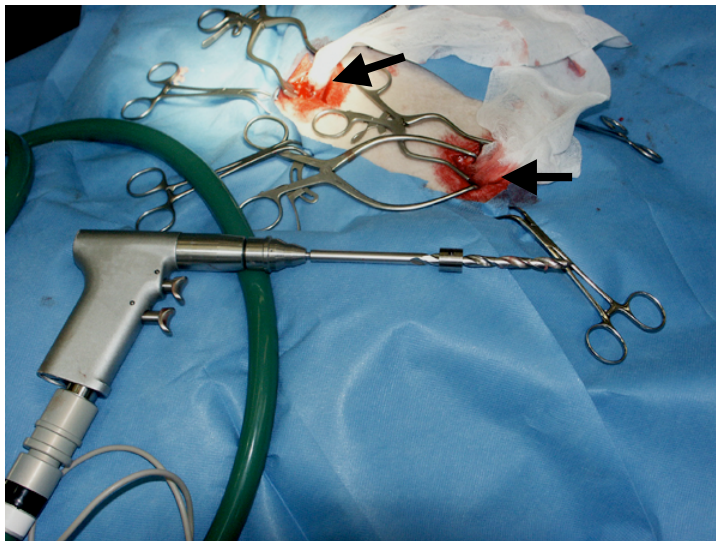


Fig. 2.3.2

*Intraoperatives Bild zweier **Defekte** welche bis zur Zementinjektion mit sterilen Tupfern gereinigt u. verschlossen wurden.*



Fig. 2.3.3

*Das Bild zeigt die Injektion des Zementes mit der **Applikationspritze** und der dazu gehörenden grosslumigen **Applikationsnadel**.*

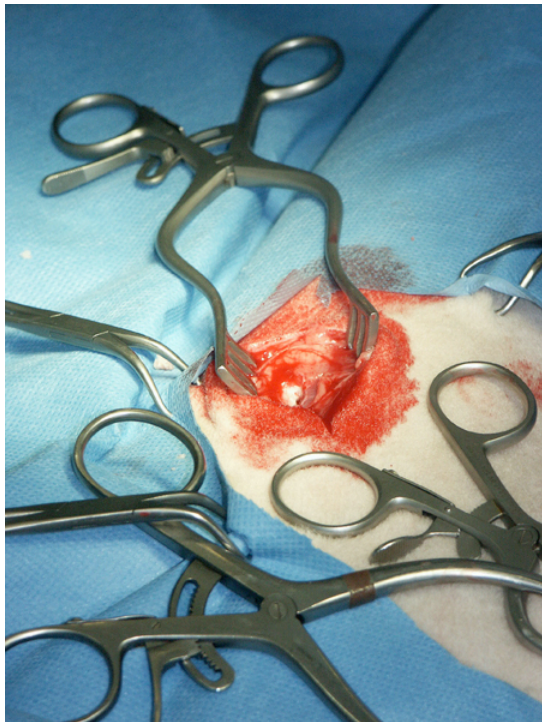


Fig. 2.3.4

Der Defekt wurde nach Zementinjektion zum Aushärten kurze Zeit offen gehalten.

Fig. 4.3.1-4.3.2 Radiologische Ergebnisse

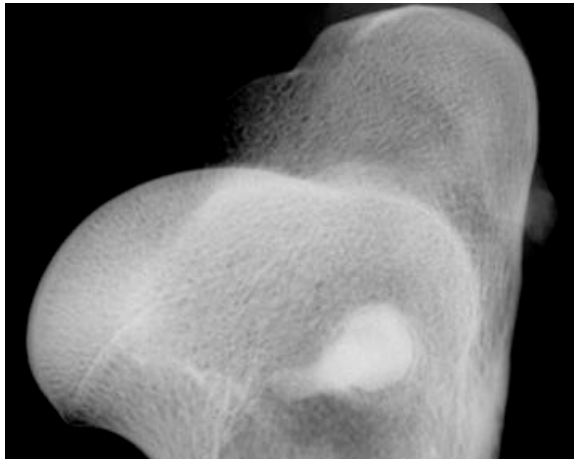


Fig. 4.3.1
*Bohrlochdefekt (Brushite), radiologisch,
Untersuchungsintervall **2 Monate:**
Der Zement ist gut vom ursprünglichen
Knochengewebe zu unterscheiden.*



Fig. 4.3.2
*Bohrlochdefekt (Brushite), radiologisch,
Untersuchungsintervall **6 Monate:**
Der Zement ist als unregelmäßig geformte
Verschattung zu erkennen.*

Fig. 4.3.3

*Diese mikroradiographische Aufnahme zeigte **Brushite** nach 4 Monaten.*

Mikroradiograph: (x5,8)

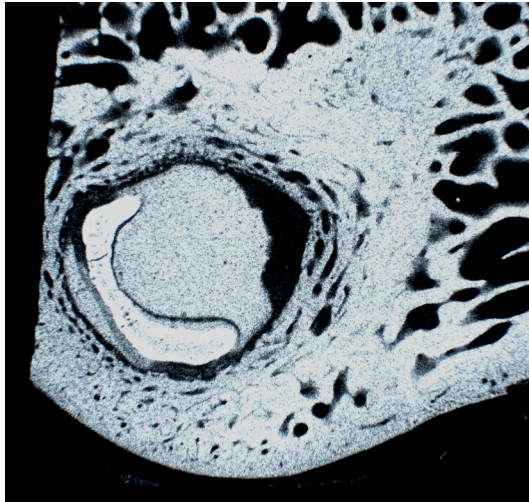


Fig. 4.3.5

***Brushite/Granules** bot nach 4 Monaten ein sehr ähnliches Erscheinungsbild wie **Brushite** da. Mikroradiographisch erschien die Verschattung des Zementes bei **Brushite/Granules** im Vergleich zu **Brushite** als inhomogener.*

Mikroradiograph: (x5,8)

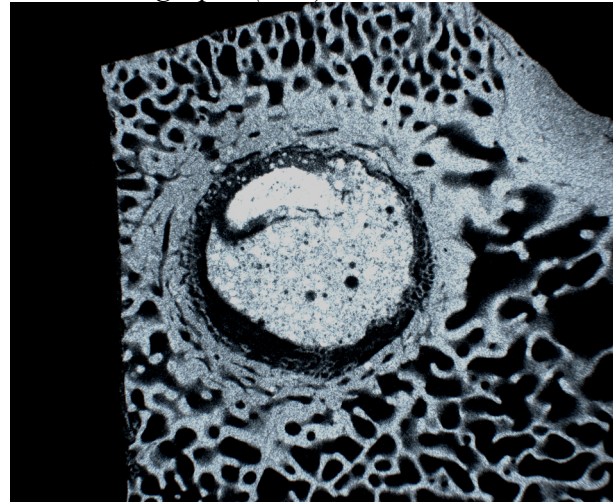


Fig. 4.3.4

*Dieses Bild zeigt **Brushite** nach 6 Monaten.*

Mikroradiograph: (x5,8)

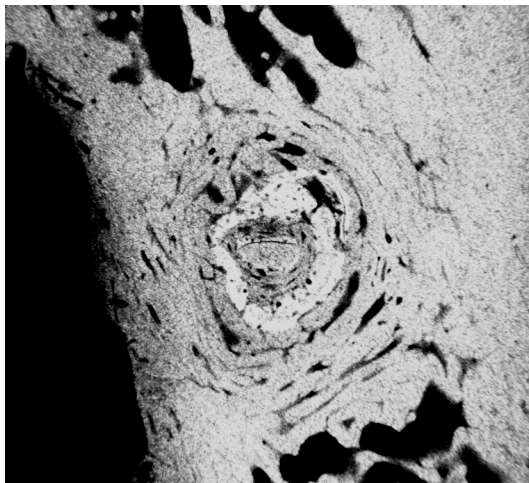


Fig. 4.3.6

*Dieses Bild zeigt **Brushite/Granules** nach 6 Monaten.*

Mikroradiograph; (x5,8)

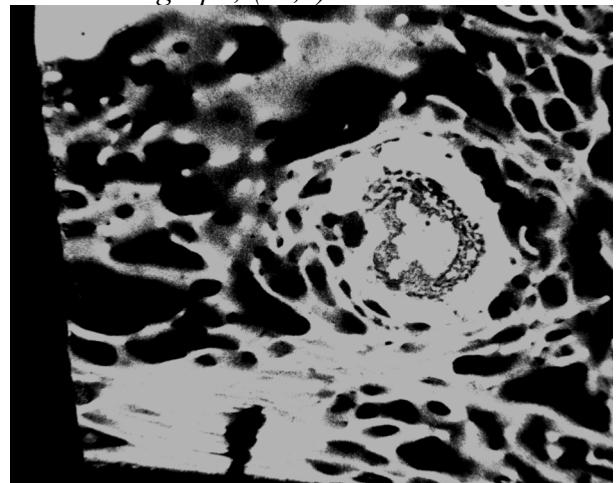




Fig.4.3.7

Fig. 4.3.7 zeigt eine kreisrunde, mehrschichtige Aufhellungszone innerhalb des Bohrloches bei **Kalziumsulfat** nach **2 Monaten**.

Fig. 4.3.8 u.4.3.9 zeigen die unterschiedliche Ausprägung der zentripetal verlaufenden trabekulären Strukturen im gleichen Beobachtungszeitraum.

Fig. 4.3.8 u.4.3.9 Mikroradiograph: (x5,8)

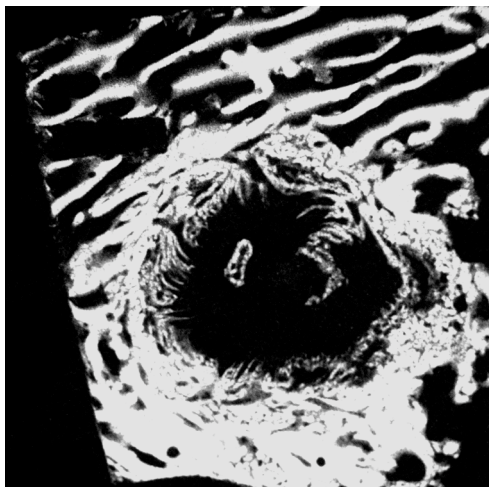


Fig.4.3.8

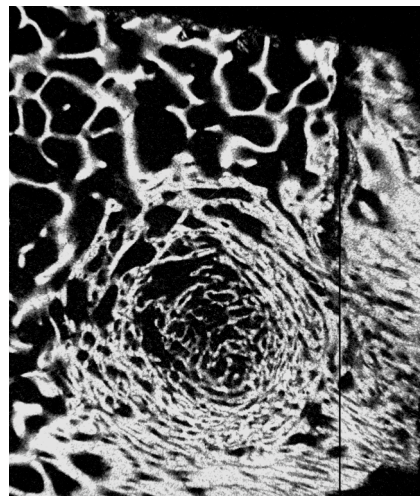


Fig.4.3.9

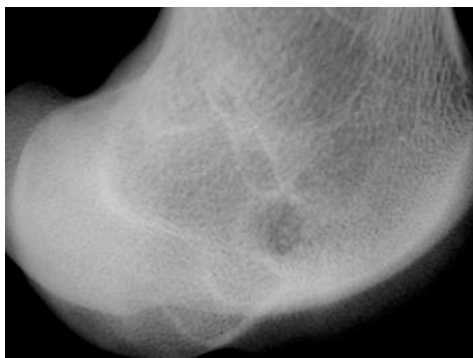


Fig.4.3.10

Fig 4.3.10 u. 4.3.11 zeigen die immer homogener erscheinenden trabekulären Verschattungen nach **6 Monaten** bei **Kalziumsulfat**.

Fig.xx Mikroradiograph: (x5,8)

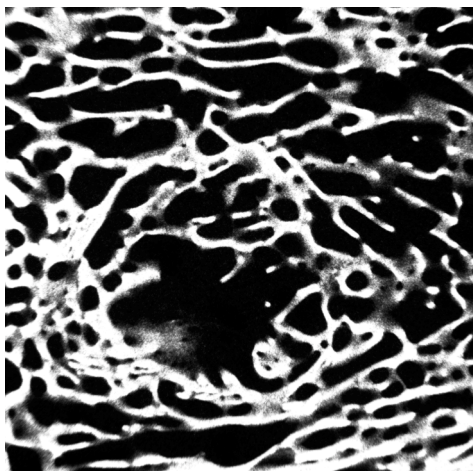


Fig.4.3.11

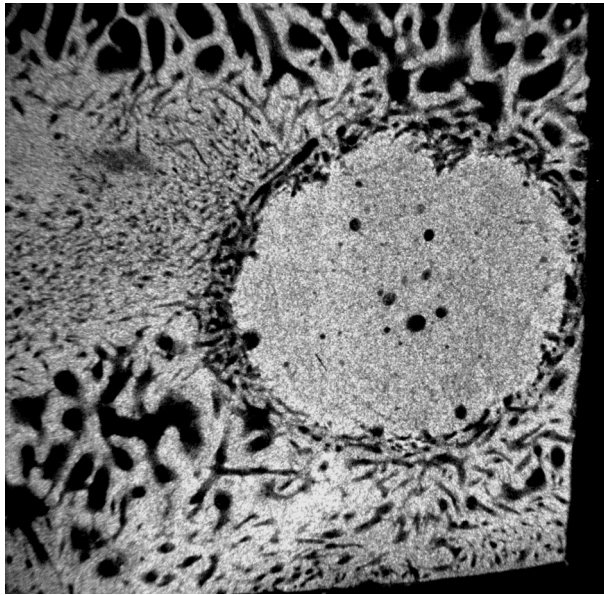


Fig. 4.3.12

*Dieses Bild zeigt eine unregelmäßige runde Verschattung bei **Norian Reinforced** nach **2 Monaten**, welche direkt an das Knochengewebe angebunden war. Ebenfalls waren faserähnlich strukturierte Aufhellungen, die den Zement durchzogen zu erkennen. Mikroradiograph: (x5,8)*

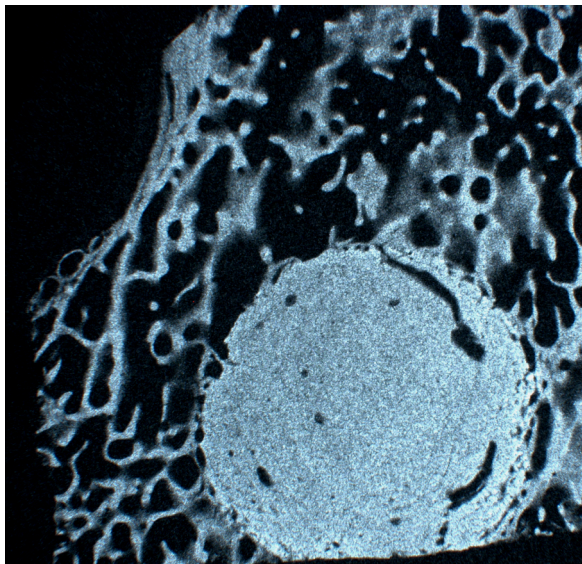


Fig. 4.3.13

*Das Implantat erschien im Vergleich zum vorherigen Beobachtungszeitraum etwas regelmäßiger nach **4 Monaten**. Mikroradiograph: (x5,8)*

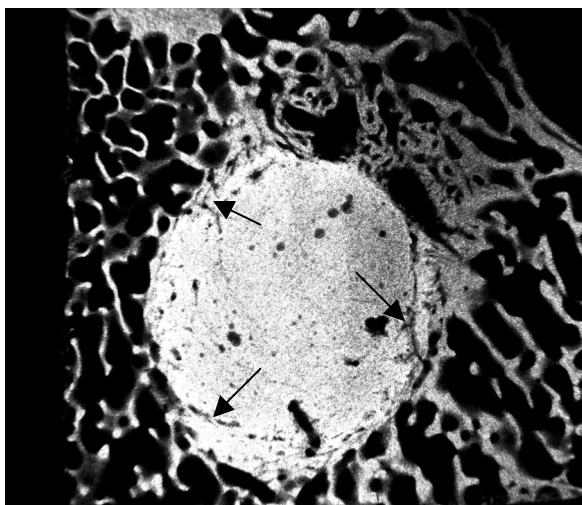


Fig. 4.3.14

*Nach **6 Monaten** erschienen bei **Norian Reinforced** vereinzelt spaltenartige Aufhellungen (Pfeile) in der Textur des Zementes. Mikroradiograph: (x5,8)*

Fig. 4.5 veranschaulicht die unterschiedlichen Resorptionsgeschwindigkeiten bei den vier geprüften Zementen.

Fig.a

Dieses Bild zeigt **Brushite** im Untersuchungsintervall von **2 Monaten**. Die rote gestrichelte Linie zeigt den Durchmesser des Bohrlochs(8mm).

Dickschnitt: 5,8x

Färbung: Toluidinblau

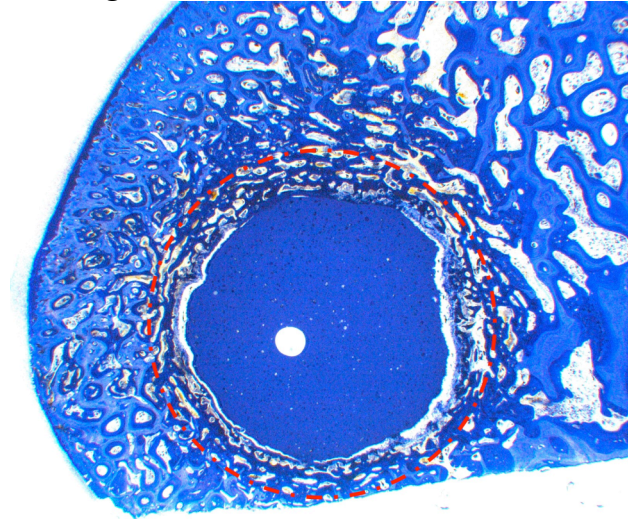


Fig.b

Das Bild zeigt **Brushite** welcher im Beobachtungszeitraum von **6 Monaten** beträchtlich an Fläche abgenommen hat.

Dickschnitt: 5,8x

Färbung: Toluodinblau

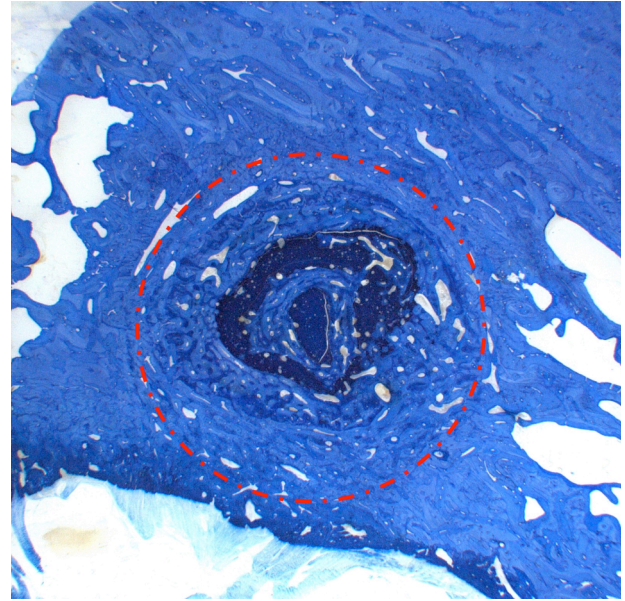


Fig.c

Das Bild zeigt **Brushite/Granules** nach **2 Monaten**.

Dickschnitt, 5,8x

Färbung: Toluidinblau

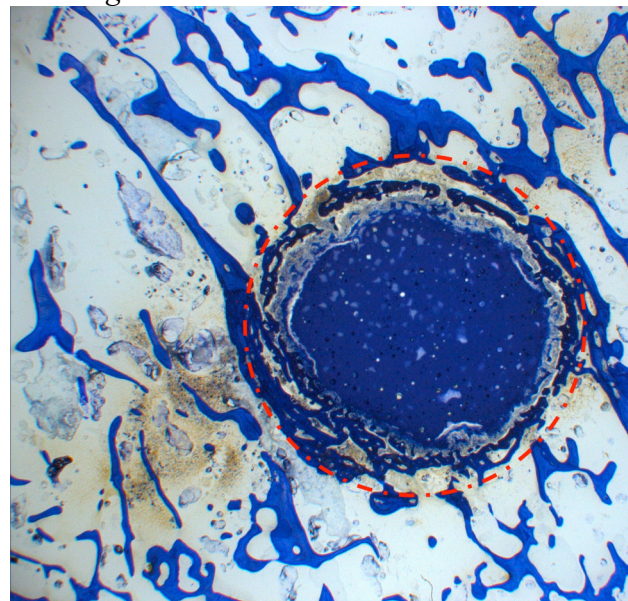


Fig.d

Das Bild zeigt den gleichen Zement im Untersuchungsintervall von **6 Monaten**.

Dickschnitt: 5,8x

Färbung: Toluidinblau

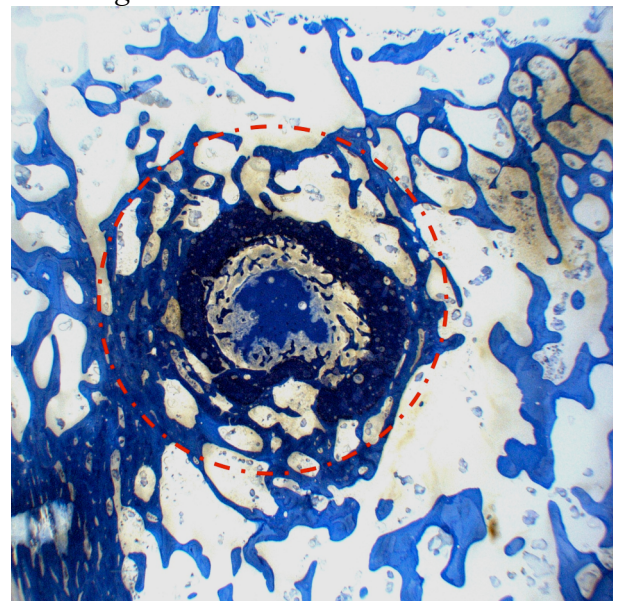


Fig. e

Zu erkennen ist die zentripetal verlaufende Trabekelstruktur bei **Kalziumsulfat** im Untersuchungsintervall von **2 Monaten**. Die rote gestrichelte Linie zeigt den Durchmesser des Bohrlochs(8mm).

Dickschnitt: 5, 8x

Färbung: Toluidinblau

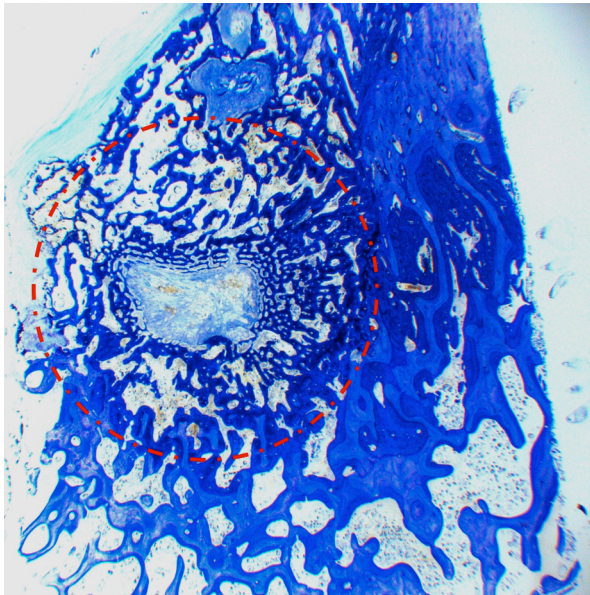


Fig.f

Das Bild zeigt die Trabekelstruktur des Knochens bei **Kalziumsulfat** nach **6 Monaten**.

Dickschnitt: 5,8x

Färbung: Toluidinblau

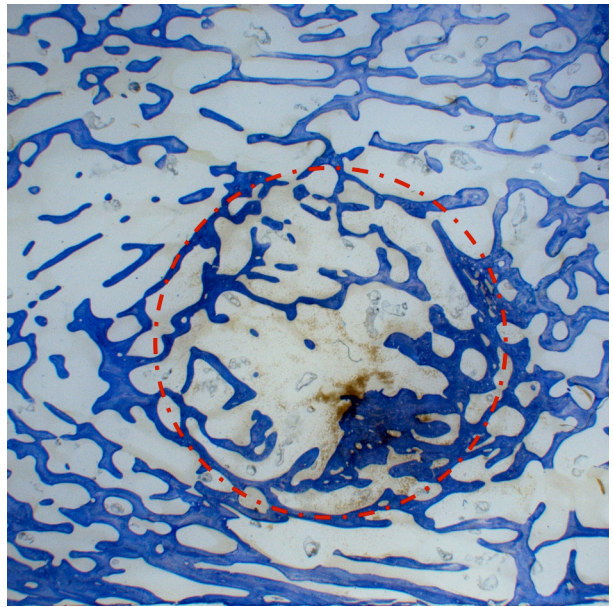


Fig.g

Das Bild zeigt **Norian Reinforced** nach **2 Monaten**.

Dickschnitt: 5,8x

Färbung: Toluidinblau

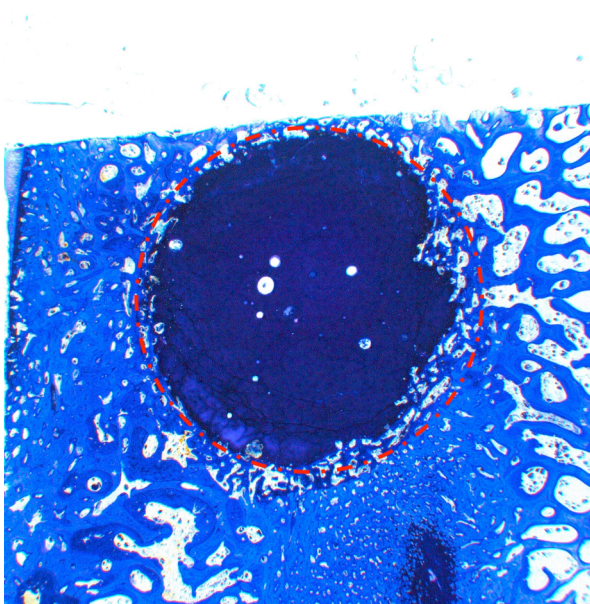
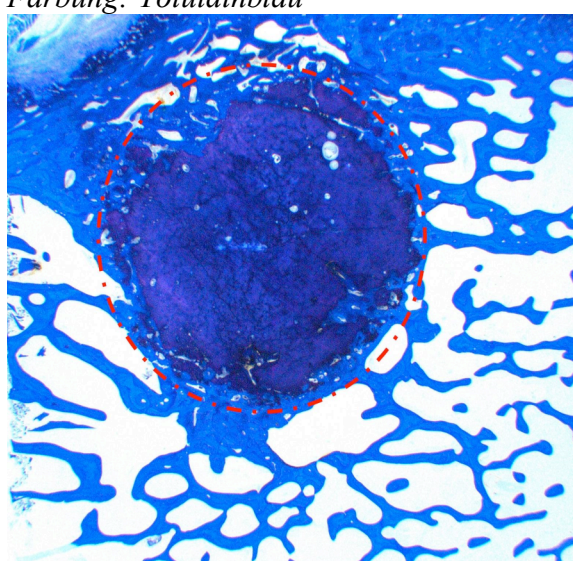


Fig.h

Norian Reinforced zeigt auch nach **6 Monaten** kaum eine Abnahme der Zementfläche.

Dickschnitt: 5,8x

Färbung: Toluidinblau



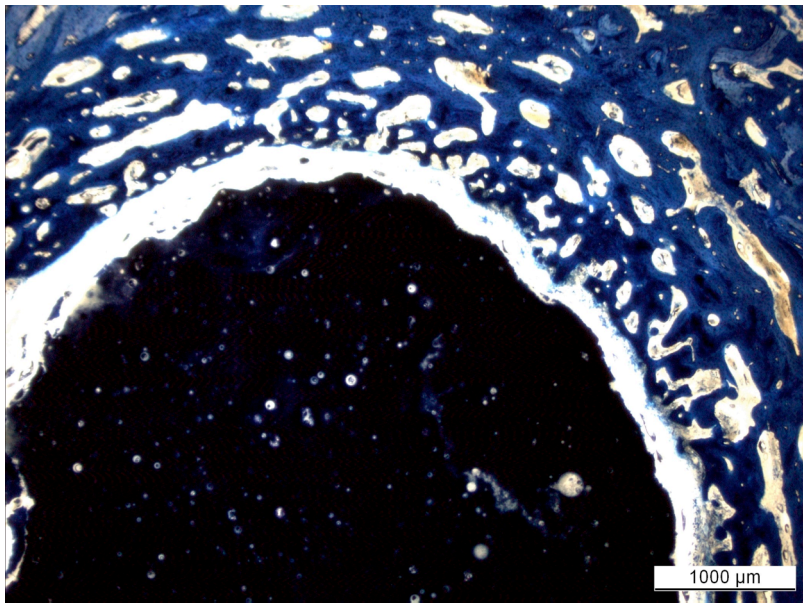


Fig. 4.5.1

Dieses Bild zeigt **Brushite** mit seiner homogenen Zementmatrix und einer deutlich ausgebildeten Reaktionszone.

Beobachtungszeitraum: **2 Monate**

Dickschnitt: (x1,25)

Färbung: Toluidin Blau

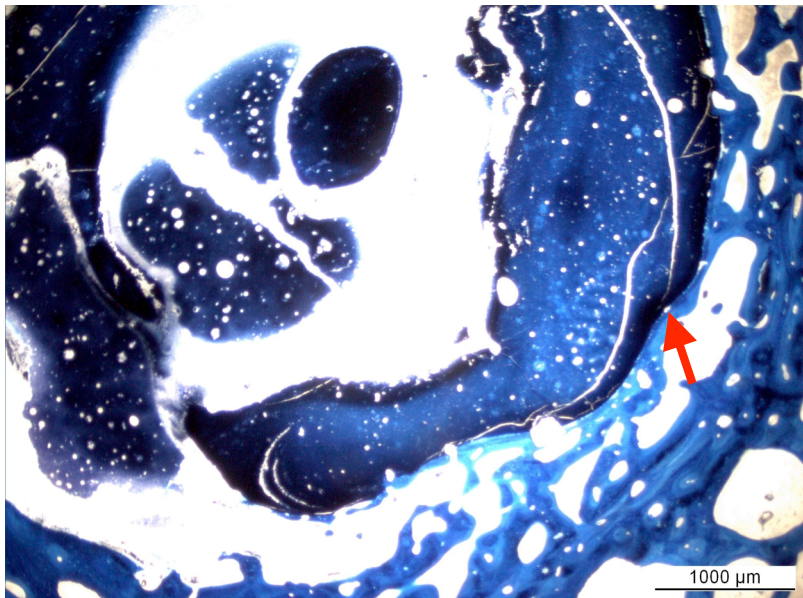


Fig. 4.5.2

Bei diesem Bild ist zu erkennen, dass bei **Brushite** nach **6 Monaten**, das neu gebildete Knochengewebe der Zementmatrix direkt anliegt (Pfeil).

Beobachtungszeitraum: **6 Monate**

Dickschnitt: (x1,25)

Färbung: Toluidin Blau

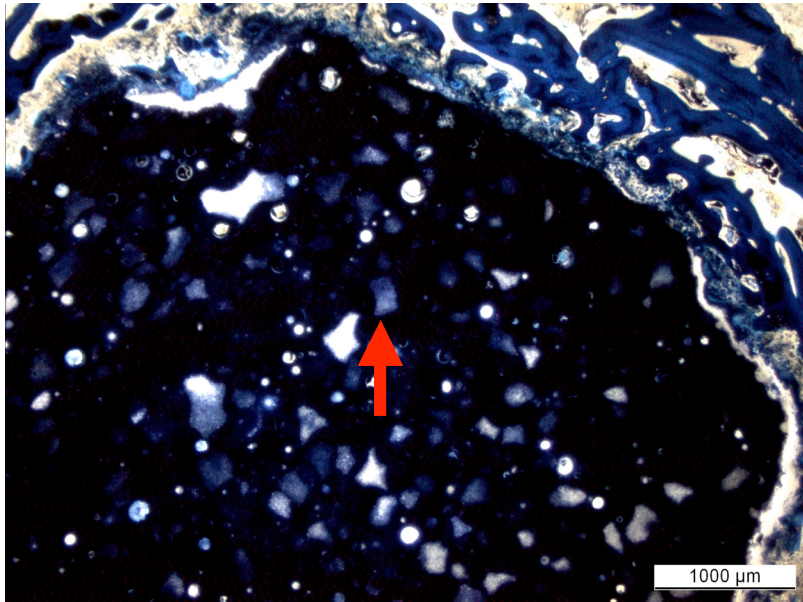


Fig. 4.5.3
 Dieses Bild zeigt **Brushite/Granules** mit in die Zementmatrix eingebetteten, fragmentartigen **β -TCP Granula** (Pfeil).
 Beobachtungszeitraum: **2 Monate**
 Dickschnitt: (x1,25)

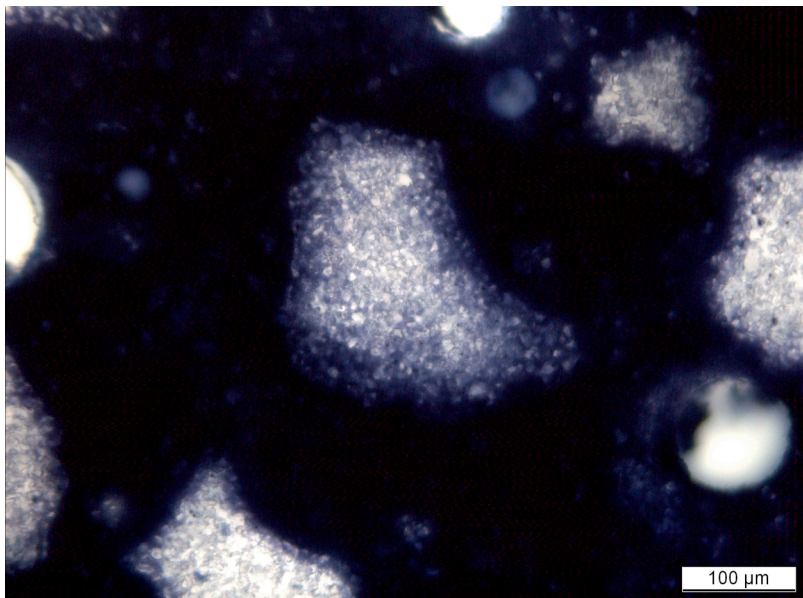


Fig. 4.5.4
 Dieses Bild zeigt ein **β -TCP** Fragment bei einer stärkeren Vergrößerung.
 Beobachtungszeitraum: **2 Monate**
 Dickschnitt: (x10)
 Färbung: Toluidin Blau

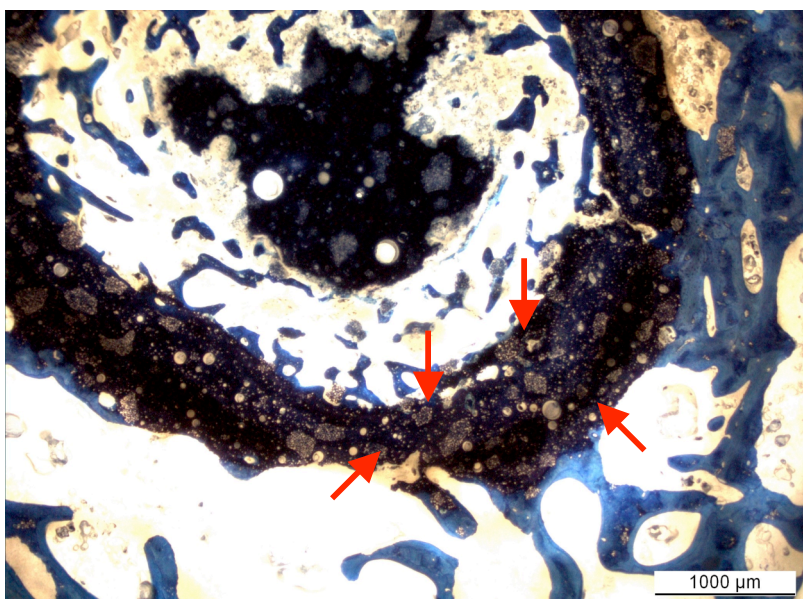


Fig.4.5.5
 Diese Aufnahme zeigt **Brushite/Granules** nach **6 Monaten** wobei die **β -TCP Granula** räumlich verdichtet schießen. (Pfeil)
 Beobachtungszeitraum: **6 Monate**
 Dickschnitt: (x1,25)
 Färbung: Toluidin Blau

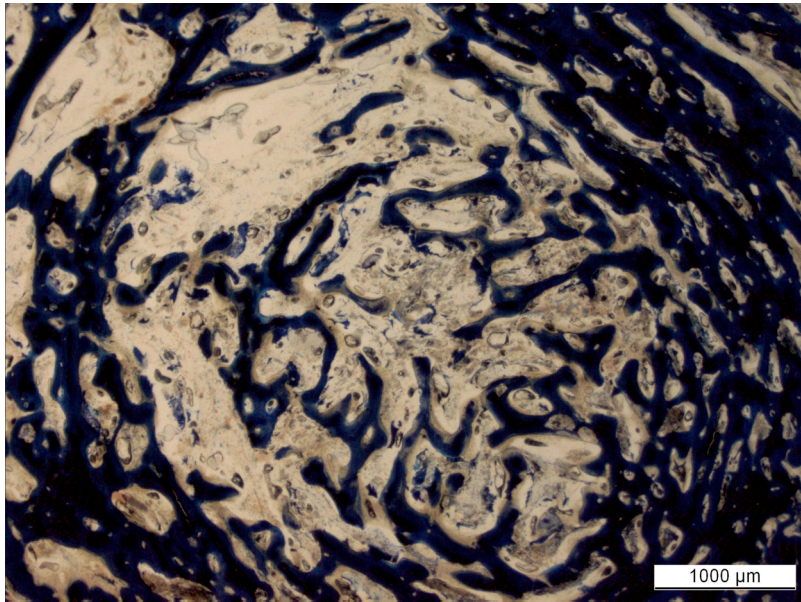


Fig. 4.5.6

Bei **Kalziumsulfat** war die Zementmatrix schon nach **2 Monaten** fast vollständig abgebaut und Knochengewebe wurde schon gebildet.
Beobachtungszeitraum: 2 Monate
Dickschnitt: (x1,25)
Färbung: Toluidin Blau

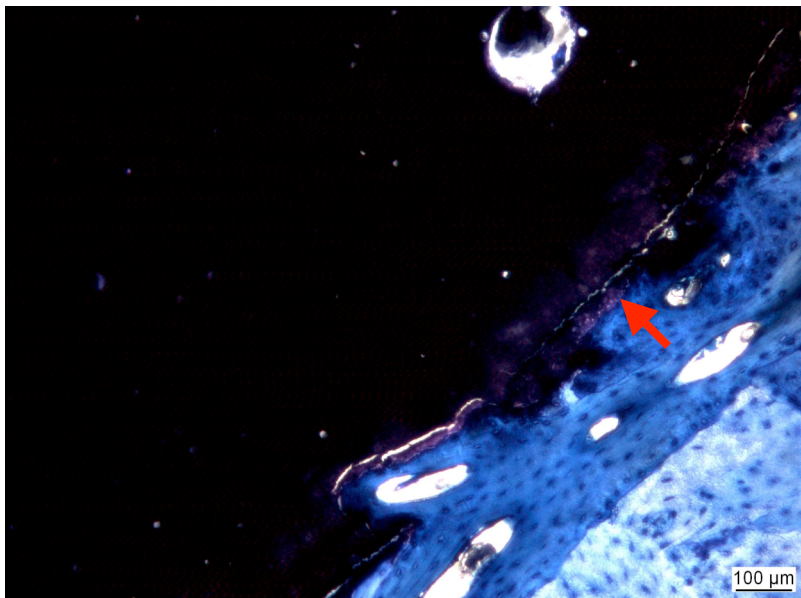


Fig. 4.5.7

Dieses bild zeigt **Norian Reinforced** nach **2 Monaten**. Eine sehr gute Knochen-Zement binding war vorhanden (Pfeil).
Beobachtungszeitraum: 2 Monate
Dickschnitt: (x5)
Färbung: Toluidin Blau

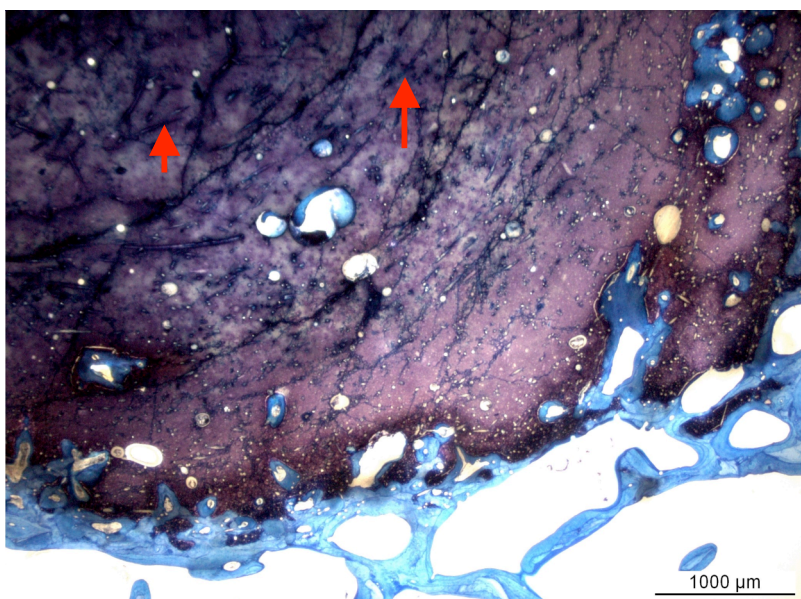


Fig: 4.5.8

Nach **6 Monaten** erscheinen bei **Norian reinforced** deutlich die **Norian Fasern** (Pfeil) in der Zementmatrix.
Beobachtungszeitraum: 6 Monate
Dickschnitt: (x1,25)
Färbung: Toluidin Blau

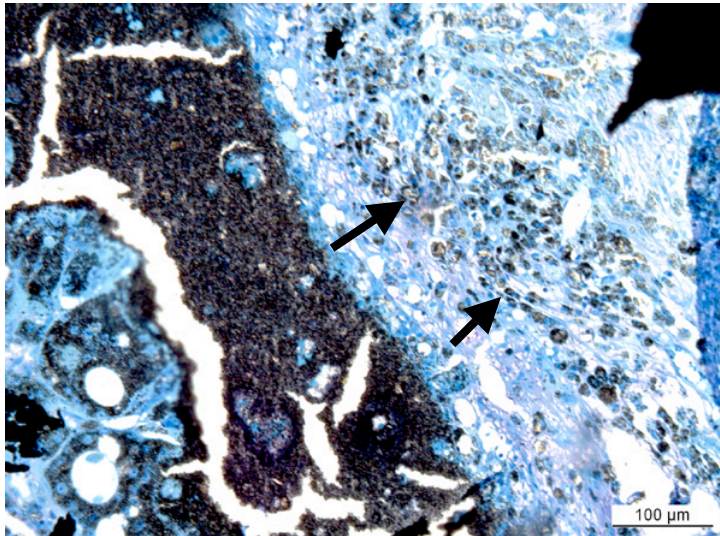


Fig. 4.5.9

Brushite (2 Monate):

*Im Bild ist der Abbau von Zement durch **Makrophagen** mit phagozytierten Zementpartikeln (Pfeil) zu erkennen.*

Dünnschnitt (x10)

Färbung: von Kossa/McNeal

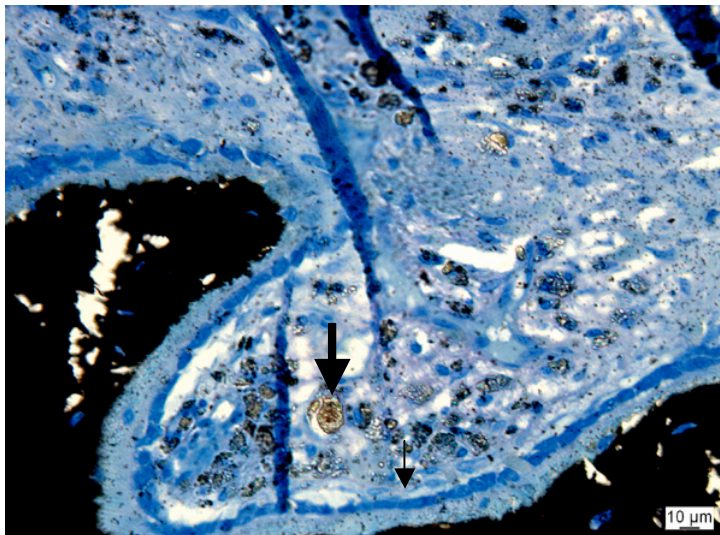


Fig. 4.5.10

Brushite (4 Monate):

*Mit Zement beladene **Makrophagen** (dicker Pfeil) und am Knochengewebe anliegende **Osteoblasten** (dünner Pfeil) sind zahlreich in der Resorptionszone erkennbar.*

Dünnschnitt (x20)

Färbung: von Kossa/McNeal

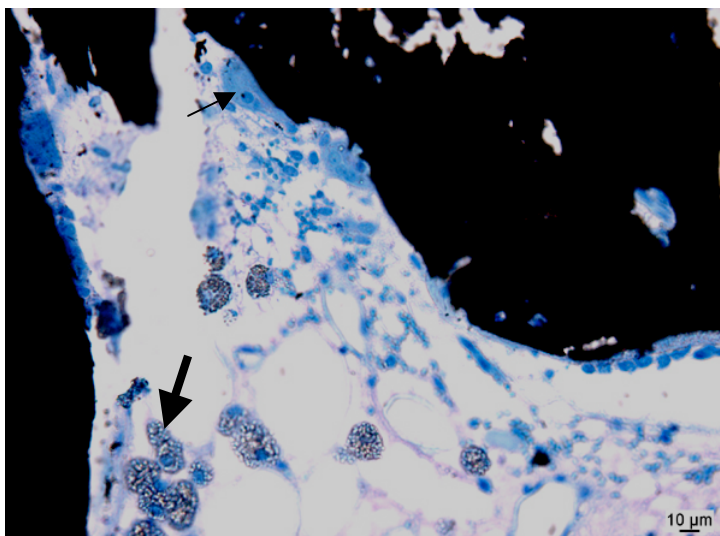


Fig. 4.5.11

Brushite (6 Monate):

*Im Bild sind **Osteoklasten** (dünner Pfeil) und beladene **Makrophagen** (dicker Pfeil) in der Bohrlochperipherie zu sehen. Bei den Makrophagen ist der Zellkern meist an die Zellperipherie gedrückt.*

Dünnschnitt: (x 20)

Färbung: von Kossa/McNeal

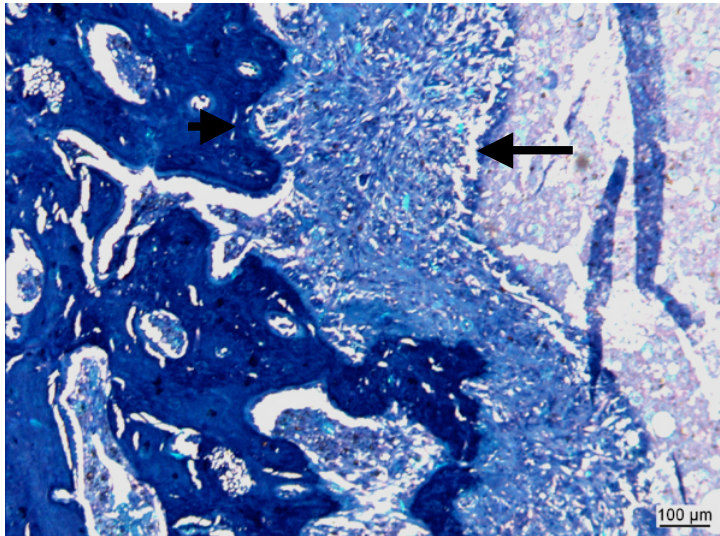


Fig. 4.5.12

Brushite/Granules (2 Monate):

*In diesem Schnitt ist eine wellenförmige **Reaktionszone** gut zu erkennen.*

Dünnschnitt: (x 5)

Färbung: Toluidin Blau

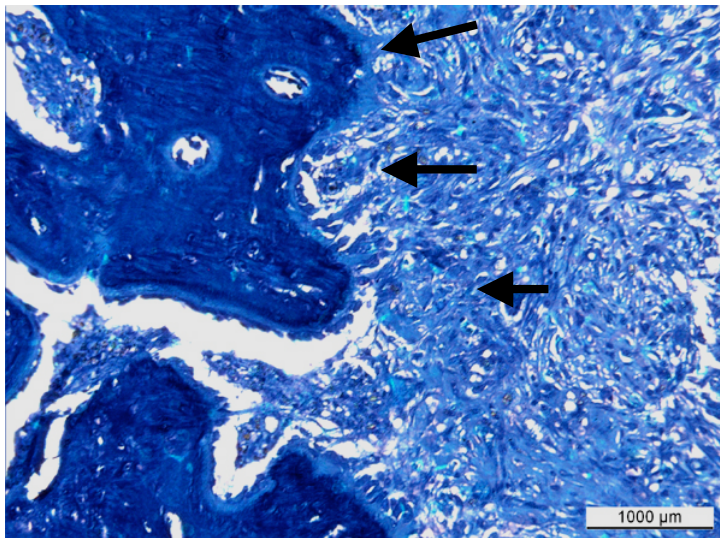


Fig. 4.5.13

Brushite/Granules (2 Monate):

***Fibröses Gewebe** an Knochengewebe angrenzend ist am Rande der Resorptionszone sichtbar.*

Dünnschnitt: (x 10)

Färbung: Toluidin Blau

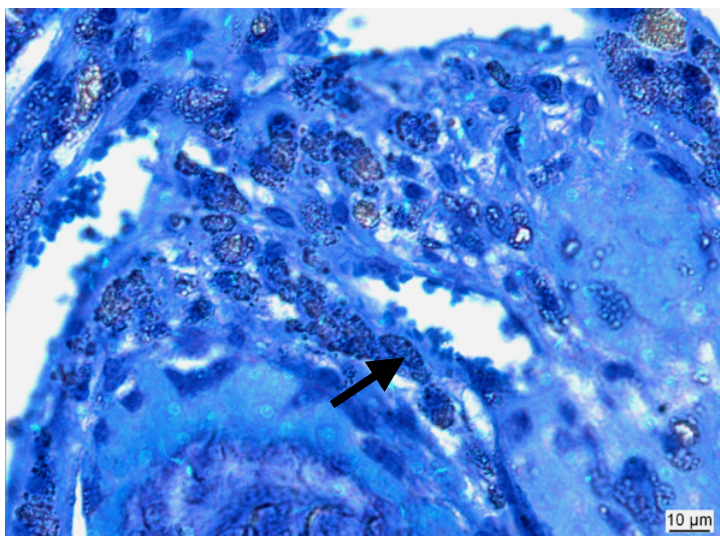


Fig. 4.5.14

Brushite/Granules (2 Monate):

***Makrophagen mit phagozytierten Zementpartikeln**, die als lichtbrechende Partikel im Zytoplasma zu sehen sind, sind vor allem in der Resorptionzone zu finden.*

Dünnschnitt: (x 40)

Färbung: Toluidin Blau

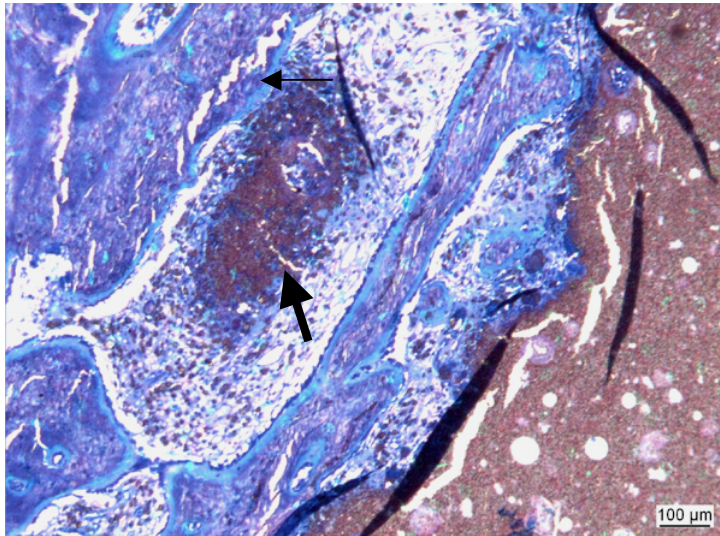


Fig. 4.5.15

Brushite/Granules (4 Monate):

*Dieses Bild zeigt einen **schollenartigen Zementrest** (dicker Pfeil) in der Reaktionszone und der Bildung **unreifen Knochens** (dünner Pfeil)*

Dünnschnitt: (x 5)

Färbung: Toluidin Blau

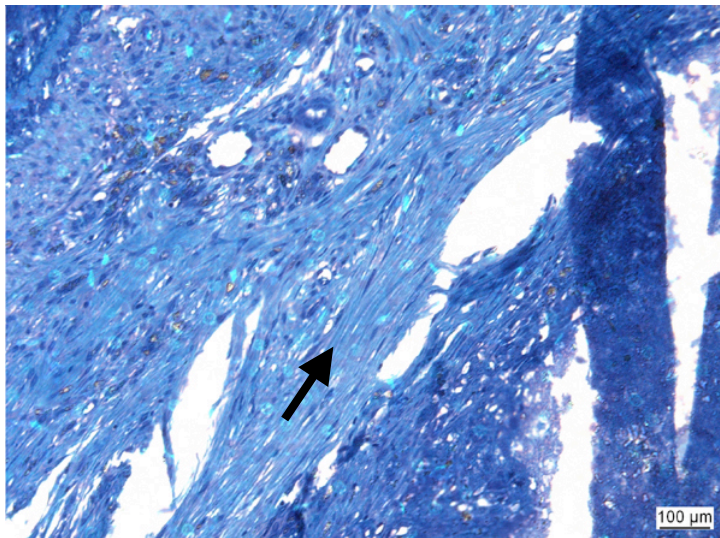


Fig. 4.5.16

Brushite/Granules (6 Monate):

*Das Bild zeigt den **geordneten Faserverlauf** im fibrösen Gewebe, welcher direkt an der Resorptionszone anschließt.*

Dünnschnitt (x 5)

Färbung: Toluidin Blau

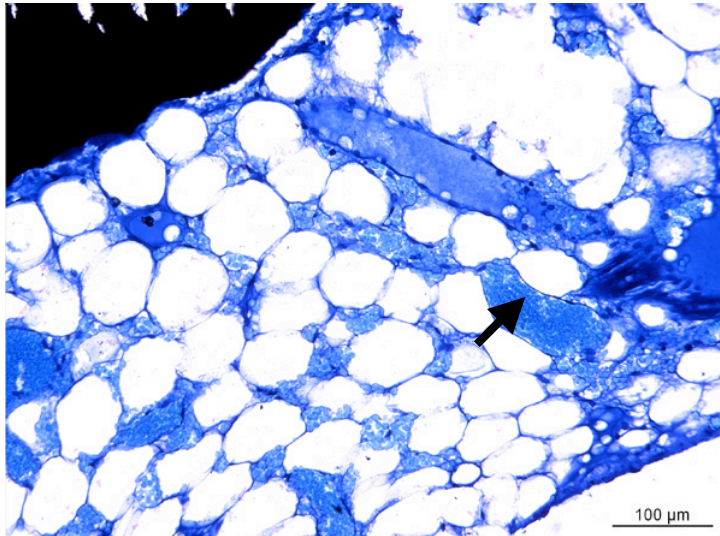


Fig. 4.5.17

*Kalziumsulfat (2 Monate):
Gefäßreiches Fettgewebe, die **E-rythrozyten** sind als türkise Zellansammlungen ohne Zellkern zu erkennen (Pfeil).*

Dünnschnitt: (x 10)

Färbung: von Kossa/McNeal

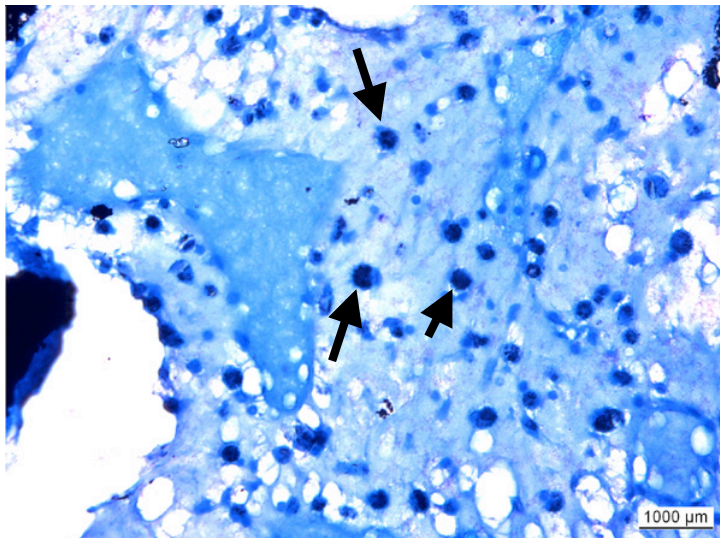


Fig. 4.5.18

*Kalziumsulfat (2 Monate): Im Mesenchymalen Gewebe sind **Makrophagen** mit Zementresten zu sehen (Pfeil).*

Dünnschnitt: (x 40)

Färbung: von Kossa/McNeal

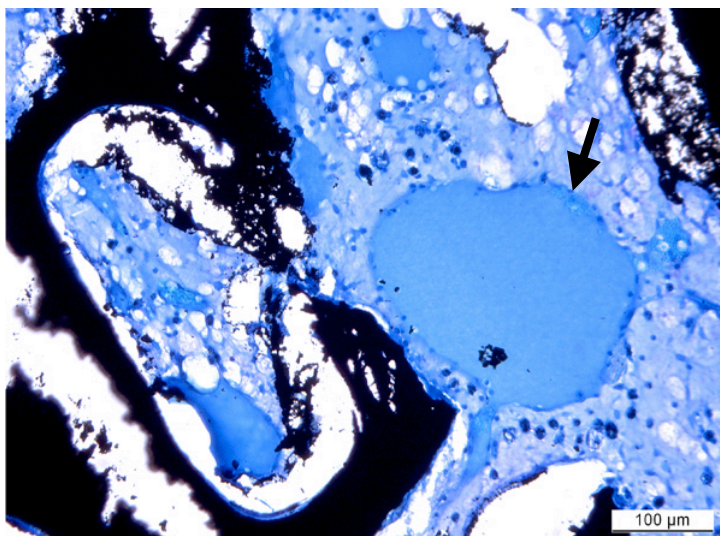


Fig. 4.5.19

*Kalziumsulfat (2 Monate):
Es traten zahlreiche **homogene seeförmige Strukturen** auf.*

Dünnschnitt: (x 10)

Färbung: von Kossa/McNeal

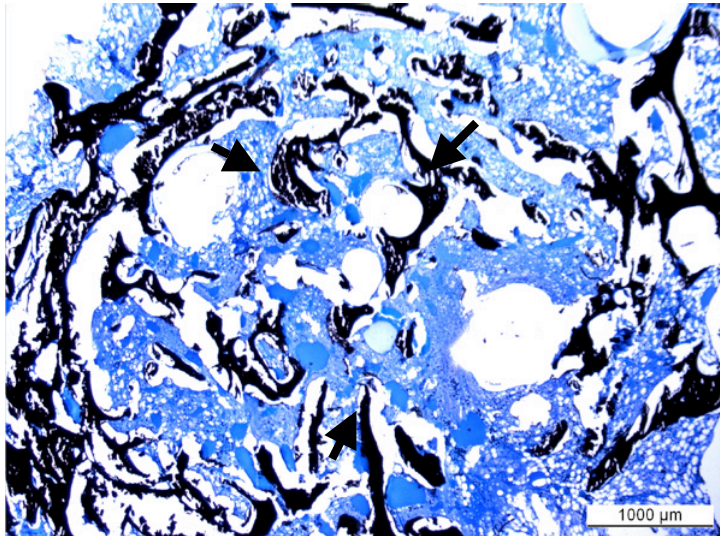


Fig. 4.5.20

*Kalziumsulfat (2 Monate):
Dieses Bild zeigt die vom Defekt-
rand aus sich bildende **zentripetale**
Trabekelstruktur des **lamellären**
Knochens.*

Dünnschnitt: (x 1,25)

Färbung: von Kossa/McNeal

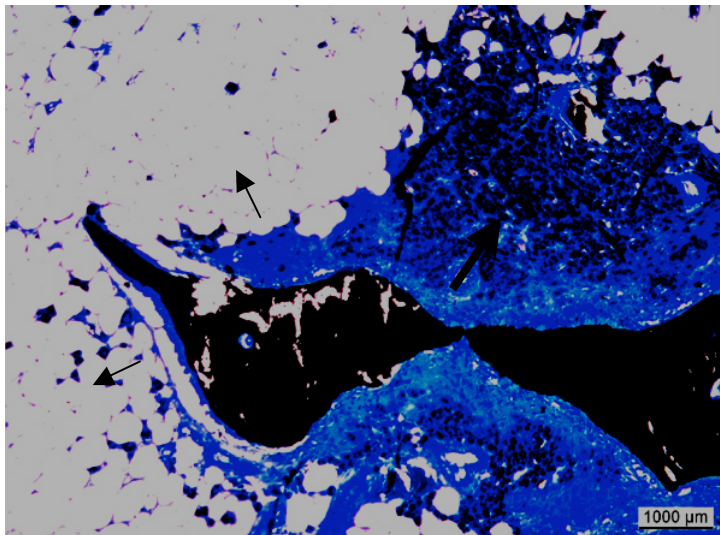


Fig. 4.5.21

*Kalziumsulfat (4 Monate):
Im Bild sichtbar ist bindegewebsar-
tiges Gewebe durchsetzt mit
Makrophagennestern (**dicker**
Pfeil) ummantelt von **Fettgewebe**
(**dünne Pfeile**).*

Dünnschnitt: (x 5)

Färbung: von Kossa/McNeal

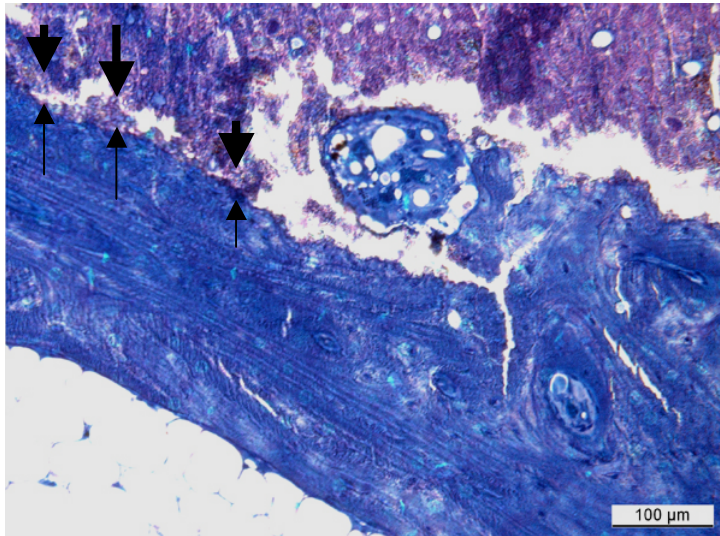


Fig. 4.5.22

*Norian Reinforced (2 Monate):
Im Bild ist der Direkte Anschluss
von **Knochengewebe** (dünne Pfei-
le) an den **Zement** (dicke Pfei-
le) erkennbar.*

Dünnschnitt: (x 10)

Färbung: Toluidin Blau

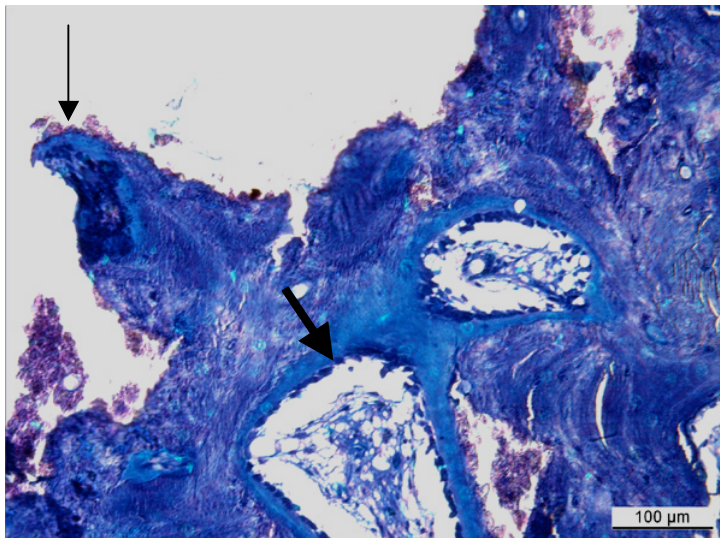


Fig. 4.5.23

*Norian Reinforced (4 Monate):
Knochenausstülpungen (dünner
Pfeil) in zentripetaler Richtung und
unregelmäßig geformte Lumen mit
Osteoblasten (dicker Pfeil) sind am
Zementrand entstanden.*

Dünnschnitt: (x 10)

Färbung: Toluidin Blau

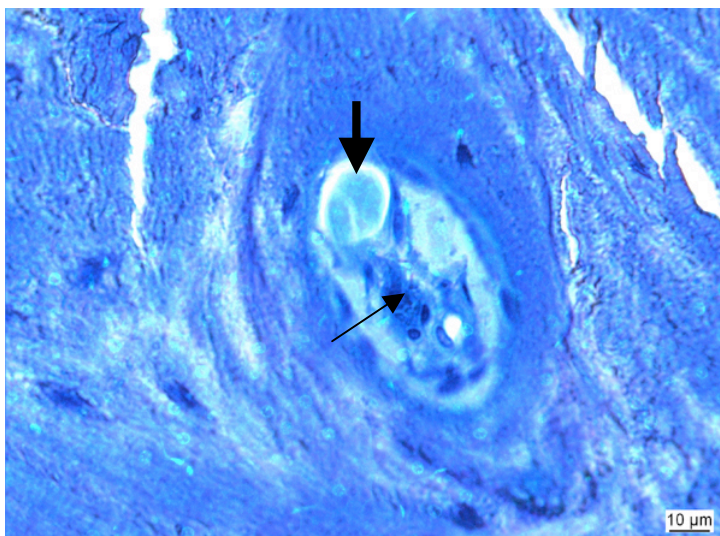


Fig. 4.5.24

*Norian Reinforced (4 Monate):
Hier erscheint ein kleines Lumen
mit einer **Fremdkörperzelle** (dün-
ner Pfeil) und einer türkisenen **No-
rian Faser** (dicker Pfeil)*

Dünnschnitt: (x 40)

Färbung: Toluidin Blau

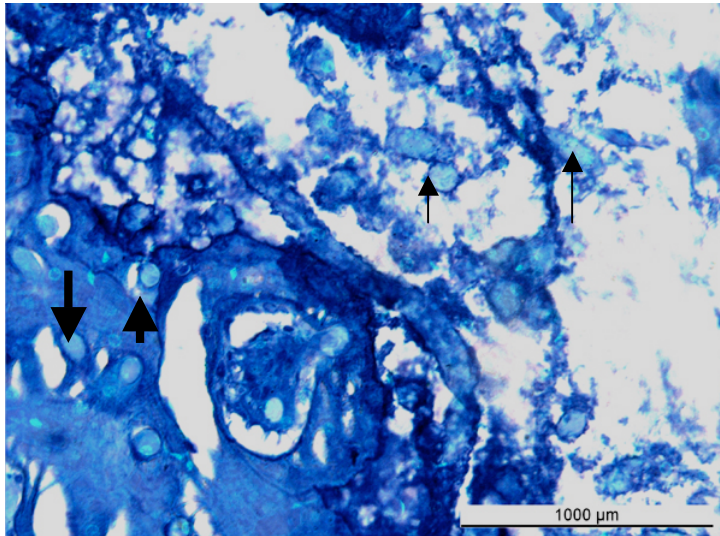


Fig. 4.5.25

Norian Reinforced (6 Monate):
Norian Fasern sind sowohl im
Zement (dünne Pfeile) als auch im
Knochengewebe (dicke Pfeile) ein-
 gebaut

Dünnschnitt: (x 20)

Färbung: Toluidin Blau

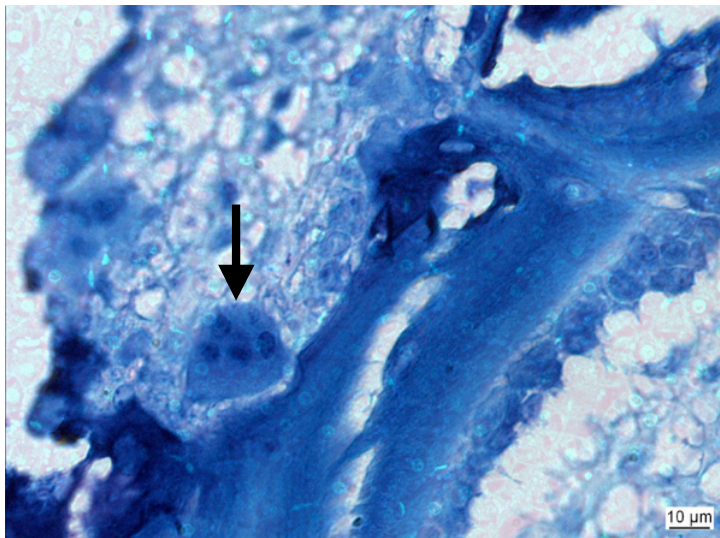


Fig. 4.5.26

Norian Reinforced (6 Monate):
 Dem neu gebildeten Knochengewe-
 be lagen **Osteoklasten** auf.

Dünnschnitt: (x 40)

Färbung: Toluidin Blau

9. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau **PD Dr. Brigitte von Rechenberg** für die Überlassung des Themas, die Unterstützung bei der Durchführung und Korrektur der Arbeit, außerdem für die hervorragende fachliche und menschliche Betreuung während dieser Zeit. Sie lehrte mich die Dinge aus einem anderen Blickwinkel zu sehen.

Vielen Dank auch an **Prof. Dr. Jörg Auer** für die Überlassung des Themas, sowie die angenehme Atmosphäre in der Pferdeklinik.

Prof. Larry Galuppo DVM, möchte ich danken für seinen Rat und bereitwillig geleistete Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Frau **Kati Zlinsky**, **Sabina Wunderlin** und **Käthi Kämpf** für die geduldigen Einweisungen und die hervorragende Arbeit bei der Herstellung der histologischen Präparate.

Es sei ebenfalls **Dr. Monika Hilbe** für ihre Hilfe bei der histologischen Auswertung gedankt.

Vielen Dank auch an meine Partner des „Synthes“ Projektes, v.a. **Frau Ilka Boecken** und **Mark Fulmer** für die gute Zusammenarbeit.

Den **Tierpflegern** des Tierspitals Zürich sowie dem Ehepaar **Gottfried und Rösli Knüsel** vom Staf-
felegghof danke ich für ihren Einsatz, die gute Zusammenarbeit und die gute Versorgung der Schafe.

Ein großes Dankeschön an meine „Kommilitonen“ und Freunde aus der MSRU: **Roland Schubotz**, **Sandra Hanses**, **Ny Hery Andrianaly**, **Dr. Alessa Waibel**, **Dr. Ruth Fichter**, **Inka Schlemmer**, **Corinne Invernizzi**, **Niels Ohlig**, **Karolin Kühn**, **Katrin Völter**, **Tanja Apfel**, **Michaela Pongratz**, **Oliver Salesov** und **Jens Langhoff**. Das gleiche gilt für den „harten Kern“ des Instituts: **Dr. Sabine Koch** und **Dr. Katja Nuss**.

Meiner Freundin **Anika Drechsler** einen großen Kuss für alles.

Abschließend möchte ich mich noch bei meiner Mutter **Ruth Génot-Röntgen** und meinem Vater **Jack E. Génot** bedanken, mit deren Liebe, Hilfe und Unterstützung ich stets rechnen konnte.....und **Oslo**.

10. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Oliver-Rolf Génot

Geboren am 2. Juni 1976 in Homburg/ Saar Deutschland

Nationalität: deutsch

Vater: **Jack E. Génot**, Amerikaner, Architekt

Mutter: **Ruth Génot- Röntgen**, geb. Röntgen, Deutsche, Informatikerin:

Schulbildung und Studium

1995	Abitur, Helmholtz Gymnasium, Zweibrücken
1995	Immatrikulation an der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
1998	Praktikum in der <i>Clinique vétérinaire du Moulin</i> , Strasbourg (Frankreich)
1999	Praktikum im Landgestüt Zweibrücken Fachgebiet Gynäkologie
2000	Urlaubssemester (Pflege meines kranken Vaters)
2001	Praktikum in der <i>Clinique vétérinaire du Moulin</i> , Strasbourg (Frankreich)
2002	Approbation

Beruflicher Werdegang

2002	Anfangsassistentenstelle in der <i>Tierklinik an der Rennbahn</i> , Iffezheim. Aufgabengebiete: Intensivmedizin, Mannschaftsbetreuung, Flugbegleitung
2003	Mannschaftstierarzt der Deutschen Springreiterequipe in Sofia (Bulgarien)
2004	Mannschaftstierarzt der Deutschen Springreiterequipe in Sofia (Bulgarien), im Auftrag der <i>Tierklinik an der Rennbahn</i> , Iffezheim und Herrn Peter Hofmann, Mannheim
2005-2006	Doktorantenstelle in der Abt. MusculoSkeletal Research Unit der Pferdeklinik der Vetsuisse Fakultät, Zürich (Schweiz) Dissertationsthema: "Evaluation von vier biodegradierbaren, injizierbaren Knochenzementen in einer experimentellen Studie in Schafen"